



Régulation de l'ostéo / adipogénèse par le Strontium pour des applications spatiales : implication des RhoGTPases

Fiona Louis

► To cite this version:

Fiona Louis. Régulation de l'ostéo / adipogénèse par le Strontium pour des applications spatiales : implication des RhoGTPases. Biologie moléculaire. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2014. Français. NNT : 2014STET005T . tel-01174134

HAL Id: tel-01174134

<https://theses.hal.science/tel-01174134>

Submitted on 8 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Régulation de l'Ostéo/Adipogénèse par le Strontium pour des applications spatiales: implication des RhoGTPases.

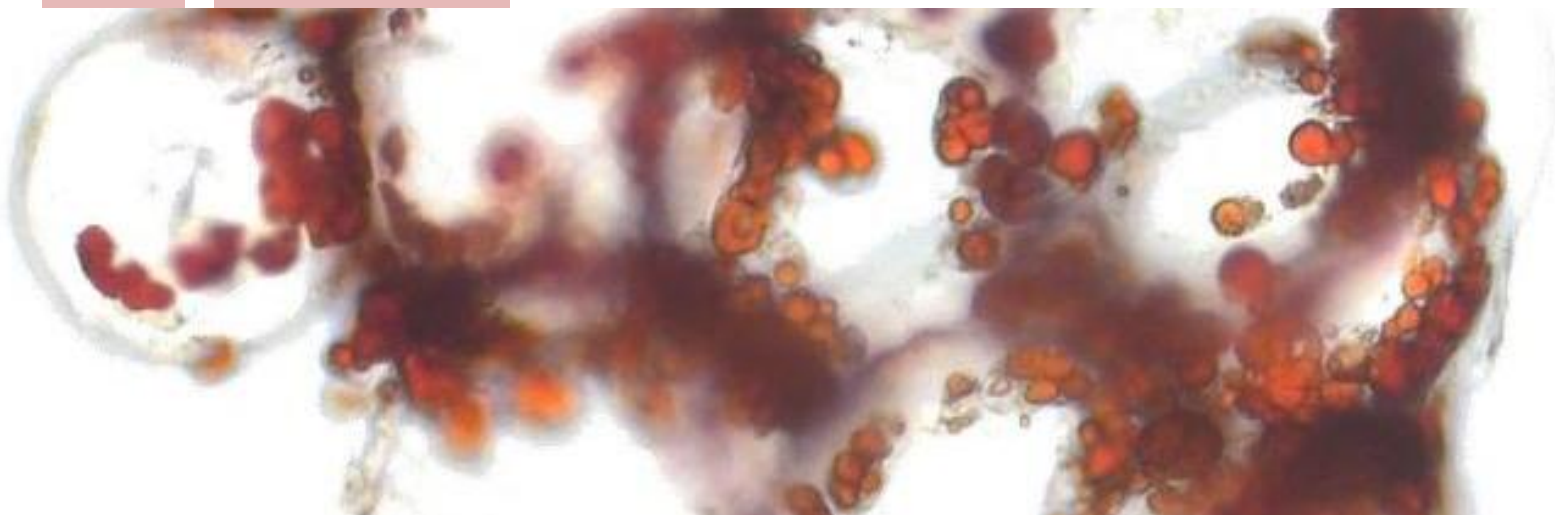
Présentée le 25 Septembre 2014 par

Fiona LOUIS

à

l'Université Jean Monnet à Saint-Etienne
Laboratoire de Biologie Intégrative du Tissu
Osseux, INSERM U1059

Ecole Doctorale Sciences Ingénierie Santé



Composition du jury :

Rapporteurs : Joëlle Amédée (Bordeaux) et Pierre Hardouin (Boulogne sur Mer)

Examineurs : Anne Blangy (Montpellier)
Anthony Perrier (Paris)
Laurence Vico (Saint-Etienne)

Directeur de thèse : Alain Guignandon (Saint-Etienne)

Composition détaillée du Jury :

Rapporteurs :

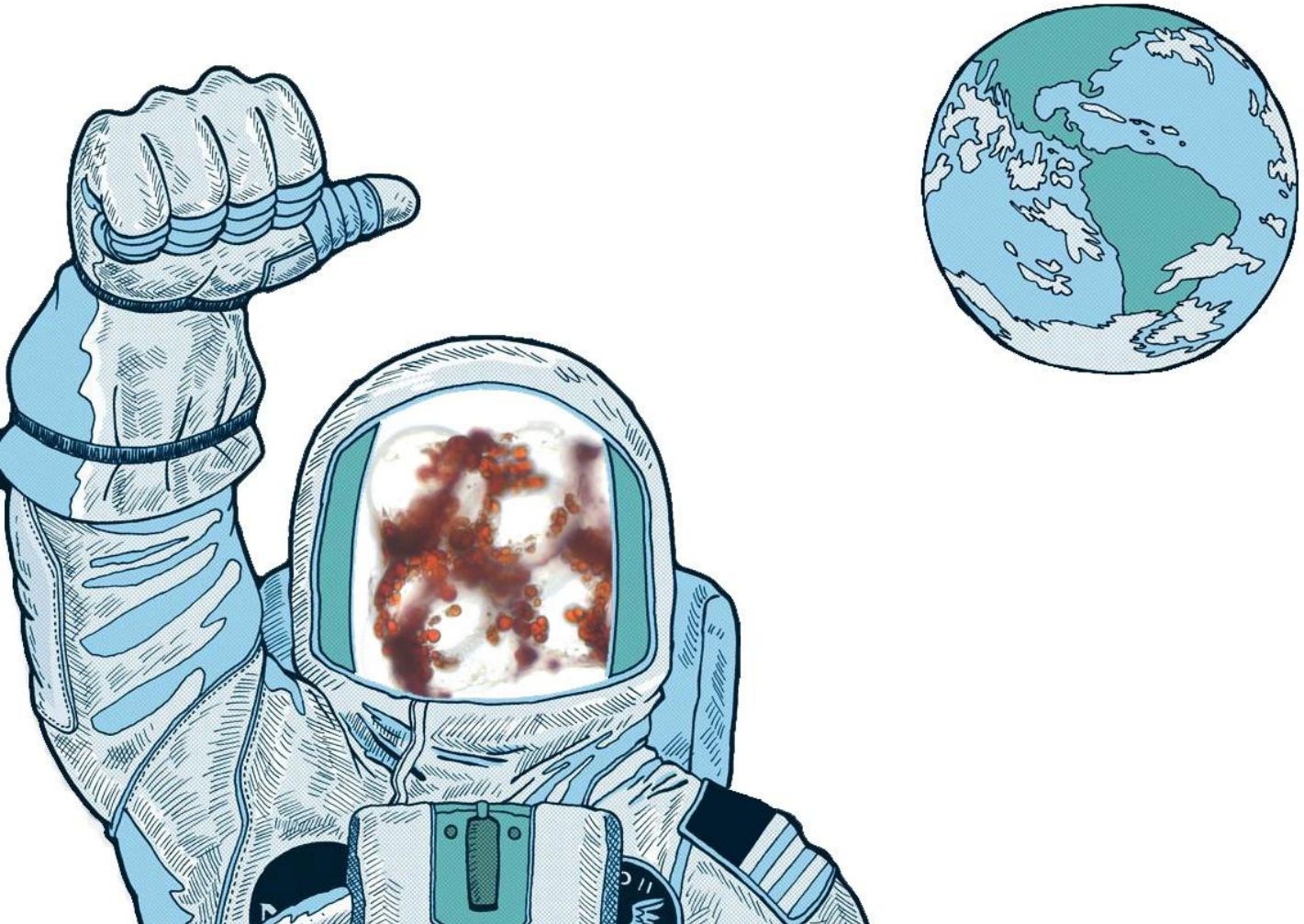
- Dr Hardouin Pierre
(Physiopathologie des Maladies Osseuses Inflammatoires, EA 4490, Université du Littoral Côte d'Opale)
- Dr Amédée Joëlle
(Bioingénierie Tissulaire (BioTis), INSERM U1026, Université Bordeaux Segalen)

Examineurs :

- Dr Blangy Anne
(Centre de Recherche de Biochimie macromoléculaire, CNRS UMR5237, Université de Montpellier)
- Dr Perrier Anthony
(Institut de Recherche International, Division thérapeutique de rhumatologie, Laboratoires Servier)
- Dr Vico Laurence
(Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, INSERM U1059, Université Jean Monnet)

Directeur de thèse :

- Dr Guignandon Alain
(Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, INSERM U1059, Université Jean Monnet)



« Rien ne bat un astronaute »

Publicité Axe Apollo



Si... la perte osseuse due à l'impesanteur ...

- Remerciements -

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Pierre Hardouin, le Dr. Joëlle Amédée, le Dr. Anne Blangy et le Dr. Anthony Perrier pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également le Dr Laurence Vico pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et suivie dans mes projets (même s'ils signifiaient d'abandonner les co-cultures). Merci pour votre disponibilité et pour avoir relu mes diverses rédactions.

Je tiens ensuite à adresser mes remerciements à mon Directeur de thèse, le Dr. Alain Guignandon. Après une première année mitigée en termes de résultats et des méthodes de travail qui ne convergeaient pas forcément dans la même direction, tu as su m'embarquer dans le fondamental et dans le monde merveilleux de la mécanotransduction, des RhoGTPases et du VEGF, qui m'ont captivés pendant ces deux dernières années ! Je te remercie pour ton énergie, ta disponibilité, ta motivation (en restant paradoxalement toujours pessimiste !) et tes discussions passionnées et infinies quant aux interprétations qui m'ont beaucoup aidées.

Je remercie également les différentes permanents du LBTO : le Dr. Aline Rattner pour son intérêt et son aide précieuse dans mes projets même professionnels ; Sylvie Peyroche pour sa bonne humeur permanente et son soutien professionnel et personnel, ainsi que le Dr. Marie-Thérèse Linossier et Mireille Thomas pour toutes nos discussions, commérages et bien sûr leur aide en RT-qPCR et ELISA : vous contribuez quotidiennement à la bonne ambiance du laboratoire ; Arnaud VanDenBossche pour son aide en « expérimentation animale » et toutes nos discussions ; le Dr Luc Malaval pour m'avoir évité les J-Club pendant une bonne partie de ma première année de thèse, croyant que j'étais en M2, et pour ses nombreuses anecdotes et blagues (même celles que je n'ai toujours pas comprises) ; le Pr. Marie-Hélène Lafage-Proust pour ses immenses connaissances et suggestions lors des Conseils Scientifiques ; le Pr. Hubert Marotte pour son sourire communicatif, ses intrusions soudaines dans le bureau, même en ne sachant mon prénom qu'en deuxième année ; Norbert Laroche pour sa sympathie et ses encouragements (tout en empêchant Alain de travailler !) ; Chantal Roche pour son sourire et son aide administrative.

Je tiens bien sûr à remercier aussi les « jeunes chercheurs » du labo encore présents ou déjà partis : Dr Wafa, ma 4^{ème} ratoune, confidente et coloc de choc pendant 5 mois chargés de bons souvenirs, merci pour tout ce que tu m'as apportée au quotidien, les moments de joies passés et à venir ;) , merci aussi à Daniel pour m'avoir supportée pendant notre « ménage à trois » ; merci à Guillaume, Damien et Laura pour tous nos éclats de rire, commérages et notre relation extra-labo qui va tellement me manquer !

(Damien, coupe toi bien régulièrement les cheveux, Guillaume ne stresse pas trop et Laura tiens le coup ! Je reviendrai vous voir !) ; merci Dr. Guénaëlle pour nos lundis « piscine-pizza-l'amour est dans le pré », et nos soirées jeux dont je garde de bons souvenirs, profite bien de ta nouvelle vie Cambridgienne ! ; merci Dr Carole pour ce joli premier article, et ce superbe congrès à Prague ! Je remercie également tous mes petits stagiaires (surtout Pierre et Malika), mais aussi Martin, Myriam, Renata, Marion, Marième, Cédric, Clémentine, Antoine et Bernard pour la bonne entente présente au labo et en dehors, merci Vasily et Anastasia pour les soirées de première année (Spoon Position !). Je n'oublie pas non plus les étudiants du LPE, du GIMAP et du BiigC : merci à Yann, Marine, Anaïs, Olivier, Pauline, Binh Minh et Aly pour tous ces midis agréables au RU ou dehors et nos soirées crêpes/sushis/guitare/karaoké ou même rouleaux de printemps qui me manquent, vivement un futur voyage au Canada !

Je remercie aussi l'ASEC (Association Stéphanoise des JEunes Chercheurs), incubateur de découvertes, de voyages et de nouvelles relations (même intimes...), ainsi que l'Ecole des Mines, pour m'avoir permise de me rapprocher de nombreuses personnes qui me sont chères : merci à Andréa, Aurélien, Agathe (copine de Swing !), Clotilde, Amélie, Baptiste, Jules, Estelle, Franck, Jean-Philippe, Giacomo (copain de salsa !), Olivier, Maxym, Dimitrios, Lara, Gwendoline... vous allez tous énormément me manquer et j'espère qu'on refera vite des soirées et des vacances ensembles !

Je remercie aussi mes meilleures amies de plus longues dates Emilie, Valérie et Charlotte pour leur soutien, leur écoute, les WE de retrouvailles à droite à gauche, qui ont toujours su m'encourager et être présentes malgré la distance et les km en train à parcourir pour se voir.

Je tiens également à dire merci à mes parents qui m'ont soutenue tout au long de mes études et dans tous mes projets même loin d'eux... merci à mon frerot préféré qui sera enfin un peu moins loin de moi... Je vous aime fort ! En parlant de famille, merci aux Boyer pour ces nombreux week-ends, la piscine à 30°C et vos encouragements !

Enfin, merci Antoine... la plus belle chose qui me soit arrivée pendant cette thèse à Saint-Etienne. On a vécu tous les deux une année chargée et difficile, rythmée par les matchs de l'ASSE (merci aussi Anthony et Sophie !), les week-ends à l'étranger, les moments de joie et de démotivation, mais avec finalement deux soutenance de doctorat à la clé. Merci pour ton soutien sans faille (jusqu'à me suivre à l'autre bout de la France...), tes petites attentions quotidiennes, ton âme d'enfant, tes blagues bizarres, tes grands yeux « huitre », ta présence simplement et pour l'amour que tu me donne. J'espère que nous pourrons bientôt reconstruire notre petit cocon à deux... Merci à toi.

TABLES DES MATIERES

TABLES DES FIGURES	I
TABLE DES ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION GENERALE.....	1
PREAMBULE	5
Des hommes dans l'espace.....	7
1. Les effets de l'impesanteur sur l'homme	9
2. Une cellule isolée peut-elle être affectée par l'impesanteur ? <i>Données théoriques</i>	11
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	15
A. LES DIFFERENTES CELLULES DE L'OS	16
A. 1. Les cellules souches squelettiques.....	17
A. 2. Les cellules du remaniement osseux	18
2. 1) L'os, un tissu organique et minéral.....	18
2. 2) Les cellules ostéoformatrices	19
2. 3) Les cellules ostéorésorbantes	20
2. 4) Synthèse	21
A. 3. Le tissu adipeux de la moelle osseuse	22
3. 1) Les différents tissus adipeux	22
3. 2) Les adipocytes jaunes ou adipocytes médullaires.....	23
A. 4. Synthèse	25
B. L'EQUILIBRE OSTEO/ADIPOGENESE.....	26
B. 1. Le VEGF	27
1. 1) Les isoformes du VEGF-A	28
1. 2) Les récepteurs du VEGF-A et leur signalisation.....	30
1. 3) La signalisation intracrine du VEGF contrôle l'engagement des CSS	31
1. 4) Les isoformes du VEGF et la différenciation des CSS	34
1. 5) Synthèse	35
B. 2. RhoGTPases et mécanotransduction.....	37
2. 1) Les protéines Rho de la famille des RhoGTPases	37
2. 2) L'importance de la matrice extracellulaire dans l'engagement des CSS	44
2. 3) Une forme cellulaire qui contrôle l'engagement des CSS	45
2. 4) La réponse des GTPases aux contraintes mécaniques	47
2. 5) La conséquence des contraintes mécaniques sur l'engagement des CSS.....	51

2. 6)	VEGF, RhoGTPases et contraintes mécaniques	52
2. 7)	Synthèse	54
B. 3.	La biologie des cellules souches squelettiques et le stress oxydant	56
3. 1)	Les espèces réactives de l'oxygène	56
3. 2)	Les systèmes de défenses antioxydants	57
3. 3)	Stress oxydant et différenciation des cellules souches squelettiques	59
3. 4)	Synthèse	64
C.	LE STRONTIUM COMME CONTRE-MESURE DES EFFETS DE L'IMPESANTEUR	66
C. 1.	Pertes osseuses sur terre et dans l'espace	67
1. 1)	L'ostéoporose sur Terre	67
1. 2)	La perte osseuse liée à l'impesanteur.....	67
1. 3)	Traitements et prévention des risques.....	69
C. 2.	Le ranélate de strontium contre l'ostéoporose	71
2. 1)	Généralités	71
2. 2)	Effets <i>in vivo</i> du strontium, actions bénéfiques et effets secondaires indésirables	72
C. 3.	Les mécanismes cellulaires actuellement connus du strontium	73
3. 1)	Un inhibiteur de l'ostéoclastogénèse	73
3. 2)	Un activateur de l'ostéogénèse.....	73
3. 3)	Un limitateur de l'adipogénèse	74
3. 4)	Les récepteurs du strontium	74
3. 5)	Le strontium dans la signalisation par cytokines entre ostéoblastes-ostéoclastes	76
3. 6)	Le rôle du NFAT et de la voie Wnt.....	76
3. 7)	Effet direct du strontium sur la phosphatase alcaline et les minéraux formés par les ostéoblastes	77
3. 8)	Strontium et RhoGTPases	77
3. 9)	Synthèse du fonctionnement du strontium.....	78
	STRATEGIE DE RECHERCHE	81
	MATERIEL ET METHODES.....	85
	Les C3H10T1/2.....	87
	Les doses de strontium utilisées	87
	Le Rotating Wall Vessel	88
	La minéralisation des billes et son action ostéoinductive	89
	RESULTATS	91
	REVUE.....	93
	Les GTPases comme acteurs clés dans l'adaptation des cellules à l'impesanteur ...	93

ARTICLE 1	121
La GTPase RhoA contrôle L'inhibition de l'adipogénèse par le strontium (modèle de cellules multipotentes).....	121
Résultats Complémentaires	140
1. Les découpleurs de la mitochondrie : PGC-1 α et UCP1	140
2. Thermogénèse et os.....	141
3. Les voies de signalisation du VEGF	145
Conclusion et discussion	148
ARTICLE 2	149
Le chlorure de strontium stimule les RhoGTPases pour contrer les altérations de l'engagement des cellules multipotentes liées à l'impesanteur simulée	149
Résultats complémentaires	174
Conclusion	177
CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALE.....	179
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	187
ANNEXES.....	209
Listes des communications et Prix	211
CV.....	212
Posters	214
- RESUME -	222

TABLES DES FIGURES

Figure 1 : La Capsule Columbia de Jules Verne.....	7
Figure 2 : La chienne Laika et youri gagarine	8
Figure 3 : Base lunaire	8
Figure 4 : Changements physiologiques des différents systèmes de l'organisme durant l'adaptation à la impesanteur.....	9
Figure 5 : Translocation des fluides pendant la phase d'adaptation à l'impesanteur	10
Figure 6 : Comparaison organisme-cellules, sédimentation des organites liée à la gravité.....	12
Figure 7 : Les différentes cellules de l'os.....	16
Figure 8 : Les différentes différenciations possibles des cellules souches mésenchymateuses.....	18
Figure 9 : Ostéoblastes observés au microscope électroniques à transmission.....	19
Figure 10 : Ostéocytes observés au microscope électroniques à transmission.....	20
Figure 12 : Le processus de formation osseuse	21
Figure 11 : Ostéoclaste observé au microscope électronique à transmission	20
Figure 13 : Les différents tissus adipeux.	22
Figure 14 : Processus de différenciation des différents tissus adipeux.....	23
Figure 15 : Adipocytes et remodelage osseux	24
Figure 16 : Voies ostéogénique et adipocytaire de différenciation des cellules souches mésenchymateuses.	25
Figure 17 : Les facteurs influençant l'équilibre entre adipo et ostéogénèse	27
Figure 18 : Epissage alternatif du VEGF-A	28
Figure 19 : Répartition des isoformes du VEGF en fonction des organes	29
Figure 20 : Le complexe VEGF matriciel - VEGFR2 s'associe aux intégrines $\beta 1$ pour augmenter le renouvellement des adhésions focales.....	30
Figure 21 : Le VEGF produit par les précurseurs ostéoblastiques stimule l'ostéogénèse des préostéoblastes par une signalisation intracrine.....	31
Figure 22 : La lamine A et le VEGF permettent l'ostéoblastogénèse par induction de Runx2 et inhibition de PPAR γ chez les cellules souches mésenchymateuses.....	32
Figure 23 : Marquages immunofluorescents du VEGFR2 et du VEGF	32
Figure 24 : Les voies autocrines et paracrines du VEGF sur les précurseurs adipeux	33
Figure 25 : Les voies de signalisation du VEGF chez les CSS.....	35
Figure 26 : Le cycle des protéines Rho de la famille des GTPases	38
Figure 27 : Structure et fonctions du cytosquelette.....	39
Figure 28 : Les RhoGTPases et leur rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine	40
Figure 29 : RhoA, Rac1 et leurs effecteurs.	40
Figure 30 : Les RhoGTPases dans la migration cellulaire.....	41
Figure 31 : RhoA active la fibrillogénèse de la matrice extracellulaire.....	42
Figure 32 : Schéma de synthèse de l'action des RhoGTPases dans la modulation du cytosquelette.....	43
Figure 33 : Le contrôle de la tension cellulaire par RhoA oriente l'engagement des cellules souches mésenchymateuses.....	45
Figure 34 : Les RhoGTPases dans l'équilibre entre adipogénèse et ostéogénèse	46
Figure 35 : Les RhoGTPases dans la voie Wnt.....	47
Figure 36 : Les différents stress mécaniques appliqués aux cellules.....	48
Figure 37 : Réponse de la GTPase RhoA aux stress mécaniques	49
Figure 38 : Signalisation de RhoA dans la voie YAP/TAZ.....	50
Figure 39 : Signalisations Yap-Tap à partir des voies GPCR et Wnt	50
Figure 40 : L'impact des contraintes mécaniques sur les CSS.....	55
Figure 41 : La NADPH oxydase, source d'ERO intracellulaires	57
Figure 42 : Le stress oxydant: un déséquilibre de l'équilibre pro/antioxydants	58
Figure 43 : Nrf2, le facteur de transcription majeur de la réponse antioxydante	58
Figure 44 : Nrf2 induit le métabolisme prolifératif via les voies du glucose et de la glutamine	59
Figure 45 : Signalisations croisées entre les GTPases et les espèces réactives de l'oxygène.....	62
Figure 46 : RhoA limite la Production d'ERO au sein des contacts focaux	63

Figure 47 : Le statut oxydant dans l'engagement des CSS	64
Figure 48 : Comparaison os sain / os ostéoporotique	66
Figure 49 : Perte osseuse corticale et trabéculaire chez 11 spatonautes après différents temps de vol	69
Figure 50 : Le strontium à l'état naturel.....	71
Figure 51 : Les voies de signalisation activées par le récepteur sensible au calcium	75
Figure 52 : Structure de la phosphatase alcaline	77
Figure 53 : Mécanismes d'action du strontium	79
Figure 54 : Le Rotating Wall Vessel (RWV), simulateur d'impesanteur	88
Figure 55 : Le découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale par la protéine UCP1	140
Figure 56 : PGC-1 α permet l'expression des gènes antioxydants.....	141
Figure 57 : Expressions des gènes de tissus adipeux blancs (adiponectine et leptine)	142
Figure 58 : Expressions des gènes de tissus adipeux bruns (PRDM16, Cidea, PGC-1 α , UCP1, PPAR α).....	143
Figure 59 : Expressions des gènes de la voie de signalisation du VEGF.....	144
Figure 60 : Le VEGF induit la biogénèse mitochondriale par la voie Akt/PGC-1 α	145
Figure 61 : Le rôle du VEGF-B dans le transport trans-endothélial des acides gras	146
Figure 62 : Expressions du VEGF-B et de la neuropiline 1.....	147
Figure 63 : RhoA active Nrf2 par phosphorylation	148
Figure 64 : Culture 3D de C3H10T1/2 sur billes.....	149
Figure 65 : Spectre infrarouge par transformée de fourier des minéraux d'hydroxyapatite.....	150
Figure 66 : Mesures d'activité et de prolifération cellulaires.....	151
Figure 67 : Expressions des gènes ostéogéniques Runx2 et Osx	151
Figure 68 : Immunomarquage fluorescent de la fibronectine et taille des agrégats adipocytaires et ostéogéniques	152
Figure 69 : Activité des GTPases RhoA et Rac1 au cours des différenciations AD et OB+Sr	174
Figure 70 : Expression des gènes RUNX2 et COL I en différenciations AD et OB+Sr.....	175
Figure 71 : Synthèse des mécanismes d'action du strontium selon l'engagements des CSS.....	178
Figure 72 : Régulations de l'engagement des CSS par le strontium sur les voies de signalisation des GTPases et du VEGF	182
Figure 73 : L'action du strontium par le biais des voies Wnt canoniques et non-canoniques	184

TABLE DES ABREVIATIONS

Akt : Protéine kinase B

ARE : Antioxidant Responsive Elements

Arp 2/3 : Protéines associées à l'actine 2/3

BCL2L11 : protéine 11 de type BCL-2 (B-cell lymphoma 2)

BMD : Densité minérale osseuse

BMP2 : Protéine morphogénétique osseuse 2

BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine

BSP : Sialoprotéine osseuse

C/EBP α : Facteurs de transcription α C/EBP « CCCAT/Enhancer binding Protein »

CaSR : Récepteur sensible au calcium

Cdc42 : Protéine 42 de contrôle de la division cellulaire

Cidea : Cell death-inducing DNA fragmentation factor-like effector-a

CSS : Cellules souches squelettiques

DMP-1 : Phosphoprotéine matricielle dentinaire-1

Dsh ou DVL : Récepteur Dishevelled

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

ET-1 : Endothéline 1

FAK : Kinase des adhésions focales

FATPs : Protéines de transport des acides gras

FGF23 : Facteur 23 de croissance du fibroblaste

Flk-1 : Récepteur-2 au facteur croissance endothéliale vasculaire

Flt-1 : Récepteur-1 au facteur croissance endothéliale vasculaire

FoxO : Forkhead-box class O

FZD : Récepteur Frizzled

GAP : Protéines activatrices des GTPases

GDI : inhibiteurs de la dissociation des nucléotides guanylés

GDP : Guanosine diphosphate

GEF : Facteurs d'échange nucléotidiques

GPCR : Récepteurs couplés aux protéines G

GPRC6 : Récepteur couple à une protéine G de la famille C groupe 6 membre A

GSH : Forme réduite du glutathion

GTP : Guanosine triphosphate

H₂O₂ : Péroxyde d'hydrogène

HA : hydroxyapatite

Hace1 : HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase 1

HO° : Radical hydroxyle

HR-pQCT : High Resolution Peripheral Quantitative Computer Tomography

HSPG : Protéoglycanes à sulfate d'héparane

IBMX : 3-Isobutyl 1-methylxanthine

IGF-1 : Facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline

IL-1 β : Interleukine 1 β

InsP3 : Récepteurs inositol triphosphate

IP3 : Inositol 1,4,5-triphosphate de type 3

JNK : Kinase Jun

Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1

LIMK : Kinases LIM

LMW-PTP : Protéine tyrosine phosphatase de faible masse moléculaire

LPL : Lipoprotéine lipase

LRP5 : Protéine 5 associée au récepteur des lipoprotéines de faible densité

Maf : V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog

MAPK : Protéines-kinases activées par des agents mitogènes

M-CSF : Facteur stimulant les colonies de macrophages

MEC : Matrice extra-cellulaire

MLC : Chaîne légère de la myosine

MMP : Métalloprotéinases matricielles

MSC : Cellules souches mésenchymateuses

MTOC : Centre organisateur des microtubules

mTOR : Cible de la rapamycine chez les mammifères

MTT : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

N^{FAT} : Facteur nucléaire des lymphocytes T activés

NF-KB : Facteur nucléaire kappa-B

NO : Oxyde nitrique

NOS : Oxyde nitrique synthase

NOX : NADPH oxydase

NMM-II : Myosine II non-musculaire

Nrf2 : Facteur 2 associé au NF-E2

NRP : Neuropiline

O₂ : Oxygène moléculaire diatomique

O₂^{•-} : Anion superoxyde

OCN : Ostéocalcine

OH : Groupements hydroxyles

OPG : Ostéoprotégérine

OSX : Ostérix

P^{AL} ou ALP : Phosphatase alcaline

PDGF : Facteur de croissance des plaquettes

PGC-1 α : Coactivateur du récepteur γ de la prolifération du péroxysome activé

PGE2 : Prostaglandine E2

PI3K : Phosphatidylinositol-kinase de type 3

PKC : Protéine kinase C

PKD : Protéine kinase D

PLC : Phospholipase C

PO₄ : Groupements phosphates

PPAR γ : Récepteur γ de la prolifération du péroxysome activé

PRDM16 : PR domain containing 16

PTH : Parathormone

Rac1 : Ras-regulated C3 botulinum toxin substrate

RANK-L : Receptor activator NF-kappa B ligand

RGD : Acide arginyl-glycyl-aspartique

RhoA : Membre homologue A de la famille de gènes de Ras

ROCK : Rho kinase

RNS : Espèces réactives de l'azote

Runx2 : Runt-related transcription factor-2

RWV : Rotating Wall Vessel

SOD : Superoxyde dismutase

Src : Proto-oncogènes codant pour des tyrosine kinases SRC

STRO-1 : Phycoérythrine

TAZ : Co-activateur transcriptionnel de YAP à motif de liaison PDZ

TGF β -1 : Facteur de croissance transformant β -1

TNF α : Facteur de nécrose tumorale α

UCP1 : Protéine découplante 1

UMR : Unités Multicellulaire de Remodelage

VEGF : Facteur endothélial de croissance vasculaire

WASP : Protéines du syndrome de Wiskott–Aldrich

Wave : Protéine homologue de la verproline du syndrome de Wiskott–Aldrich

YAP : Protéine Yes-associée



INTRODUCTION GENERALE

A côté des radiations cosmiques, des tempêtes solaires, du confinement ou du "mal de l'espace"... un danger plus insidieux menace la santé des astronautes : l'affaiblissement de leurs os. Un spationaute à bord de la Station Spatiale Internationale, perd en moyenne autant de masse osseuse en un seul mois qu'une personne âgée atteinte d'ostéoporose en un an !

La solution serait de ne jamais revenir, malheureusement les stocks de nourriture et d'oxygène ne sont pas éternels et les spationautes devront regagner la Terre. Si pour une mission de dix jours, le rétablissement peut s'effectuer en quelques heures, il en va autrement après un séjour de plusieurs mois en apesanteur. Certains astronautes souffrent encore d'une carence osseuse deux ans après leur retour !

Malgré l'arsenal thérapeutique de traitements contre l'ostéoporose actuellement disponible, et malgré les heures d'exercices physiques quotidiennes effectuées par les astronautes en vol, aucune contre-mesure efficace n'a encore été mise en évidence. Le Ranélate de Strontium est une substance intéressante dans la mesure où elle a une double action, en limitant d'une part la résorption osseuse et en augmentant d'autre part la formation osseuse. Sur les cellules souches de la moelle osseuse, elle inhibe l'adipogénèse et active l'ostéoblastogénèse, rééquilibrant ainsi le métabolisme osseux en faveur de la formation. Toutefois, son action cellulaire reste encore floue, ainsi que les différentes voies de signalisation qu'elle module. Contrairement à ce qu'on pourrait penser, le fait que le strontium soit très proche du calcium n'implique pas forcément les mêmes mécanismes.

Les petites protéines Rho de la famille des GTPases, sortes d'interrupteurs moléculaires qui régulent de nombreuses voies métaboliques en plus de permettre l'élaboration de la structure de la cellule, qu'est son cytosquelette, nous sont apparues comme pouvant agir dans l'action du strontium. Quel autre composant que le cytosquelette serait le premier altéré par une soudaine disparition de la gravité ? Car si l'organisme entier réagit à l'apesanteur, chacun de ses organes et surtout chacune de ses cellules répondent aussi à l'absence de gravité, par des mécanismes encore mal connus. De même, de nombreuses voies de signalisation qui contribuent à l'activation ou à l'inhibition des RhoGTPases sont encore, pour la plupart, à découvrir.

Une voie de signalisation peut aussi être déterminante dans la réponse des cellules souches à l'impesanteur ou au strontium, c'est celle du facteur endothélial de croissance vasculaire (VEGF), un facteur de croissance dont les effets dépassent de loin le simple contrôle de l'angiogénèse, et qui apparaît pour nous comme un acteur clé dans l'équilibre entre adipo et ostéogénèse. Par ailleurs, l'ostéogénèse et la formation osseuse sont très dépendantes de sa signalisation (Voir Le VEGF p.27).

Cette voie, ayant la capacité d'interagir avec les intégrines, les contacts focaux et pouvant ainsi stimuler les RhoGTPases, ne peut que nous encourager à étudier plus en profondeur son rôle. De plus, le VEGF a souvent été montré comme étant stimulé en cas de contraintes mécaniques, notamment son isoforme matricielle, montrant l'importance de ce gène qui semble mécanosensible avec une localisation modulée par la mécanotransduction.

Les GTPases sont au carrefour de beaucoup, voire peut être de toutes, les voies de signalisation répondant aux stimuli mécaniques, dont font partie celles du VEGF et de ses récepteurs. Si fondamentalement, de plus en plus de données apparaissent pour les cellules différenciées, peu sont connues sur l'importance de ces voies de régulation et la destinée de cellules multipotentes.

Introduction générale

Les éléments mis en jeu dans une cellule sous contraintes mécaniques se caractérisent par des déstabilisations de complexes protéiques, notamment les contacts focaux, qui vont moduler localement la formation d'espèces réactives de l'oxygène et ainsi le statut oxydant de la cellule. Les GTPases sont sensibles à ces réactions d'oxydo-réduction et tous ces éléments participent donc à la réorganisation du cytosquelette, à la tension cellulaire et à la destinée des cellules souches.

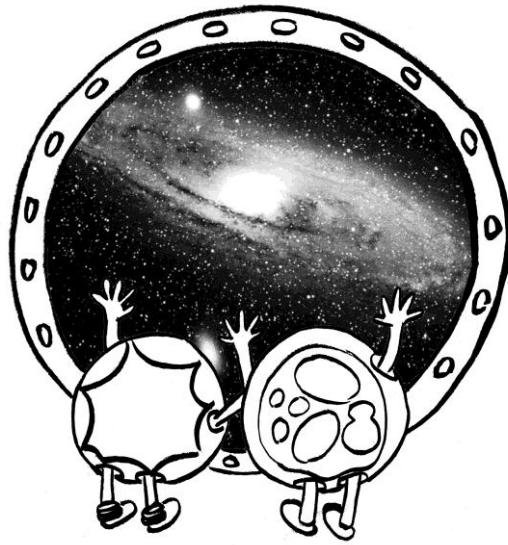
En vue de toutes ces données, l'objectif de ce travail de thèse est donc de montrer l'importance des RhoGTPases et de la voie des isoformes du VEGF pour contrecarrer les effets de l'impesanteur sur les cellules souches mésenchymateuses.

Tout d'abord, le préambule de ce document présente l'influence de l'impesanteur sur l'homme et sur des cellules isolées *in vitro*.

Puis, le chapitre de synthèse bibliographique est organisé en deux parties : une première qui s'attache à décrire l'équilibre finement régulé entre ostéo et adipogénèse, important pour la compréhension des conséquences de l'impesanteur; et une deuxième partie sur le strontium comme proposition de contremesure aux multiples signalisations cellulaires.

Le deuxième chapitre est consacré aux résultats, avec tout d'abord une revue synthétisant les effets cellulaires de l'impesanteur et montrant comment les RhoGTPases sont les acteurs clés à étudier dans ces modulations. Puis viennent les résultats expérimentaux, s'articulant en un premier axe sur l'effet *in vitro* 2D du strontium sur le statut oxydant durant l'adipogénèse et, en un deuxième axe, sur son impact en culture 3D simulant l'impesanteur, par le biais de la voie du VEGF matriciel et des RhoGTPases.

Enfin, une conclusion et discussion générale viendra terminer ce manuscrit, mettant en perspectives l'usage des C3H10T1/2 comme modèle d'adipocytes médullaire, le strontium et les minéraux apatitiques comme agent ostéogénique, ainsi que l'importance des voies de signalisation du VEGF, tout en abordant la stratégie qui sera adoptée lors du prochain vol spatial en impesanteur réelle.



PREAMBULE

Des hommes dans l'espace.....	7
1. Les effets de l'impesanteur sur l'homme	9
2. Une cellule isolée peut-elle être affectée par l'impesanteur ? <i>Données théoriques</i>	11

DES HOMMES DANS L'ESPACE

Dès le XVII^e siècle, la littérature met en avant l'exploration spatiale et la découverte des extraterrestres. Les auteurs, tels que Jules Verne (*De la Terre à la Lune*, 1865) ou Herbert George Wells (*Les Premiers Hommes sur la Lune*, 1901), sonnent les débuts de la science-fiction et du rêve de l'exploration de l'espace.



FIGURE 1 : LA CAPSULE COLUMBIA DE JULES VERNE.

De la Terre à la Lune, 1865, dessin de Henri de Montaut 1868.

Verne avait proposé un projectile-capsule en forme de balle, tiré d'un long canon nommé Columbia et permettant à trois explorateurs d'atteindre la vitesse de libération nécessaire à quitter l'attraction terrestre (Figure 1). En 1865, on commençait à s'inquiéter de la capacité des humains à survivre à de telles vitesses extrêmes. Verne avait même fait des calculs à propos de la longueur du canon nécessaire pour survivre à un lancement vers la Lune. Près de 100 ans plus tard, les États-Unis ont utilisé une capsule Apollo, de forme très similaire, nommé *Columbia* pour envoyer trois astronautes : Armstrong, Collins, et Aldrin, vers la Lune et revenir sur Terre...

Les premiers voyages spatiaux étaient balistiques. Ils ne permettaient pas d'aller en orbite, mais juste de s'élever à une trentaine de kilomètres du sol terrestre, et d'être en impesanteur (10^{-3} à 10^{-6} g) pendant une durée très courte, allant de quelques secondes à quelques heures. Ces voyages ne donnaient que peu d'opportunités pour réaliser des expériences scientifiques.

Ce sont les vols orbitaux à partir des années 50, qui ont permis les premières investigations scientifiques, avec des durées allant de quelques jours à plus d'une année. Les scientifiques se sont intéressés aux expressions des gènes, aux voies de régulation, à la physiologie et au développement des organismes envoyés. Américains et Soviétiques ont utilisé dès 1948 des chiens (la première étant la chienne Laika en 1957), des singes et des rongeurs pour préparer les vols habités. Depuis, de nombreux animaux ont été intégrés à des vols spatiaux, de l'escargot au singe. Tout ceci précédant le premier vol spatial d'un homme : Youri Gagarine, en 1961 (Figure 2).

A l'heure actuelle, le monde est plus que jamais ouvert sur l'espace. Les découvertes de la fin du 20^{ème} siècle ont rendu encore plus attractif le domaine spatial : aujourd'hui, dans un monde où les ressources naturelles diminuent inexorablement, beaucoup pensent que l'avenir de l'homme est dans l'espace.

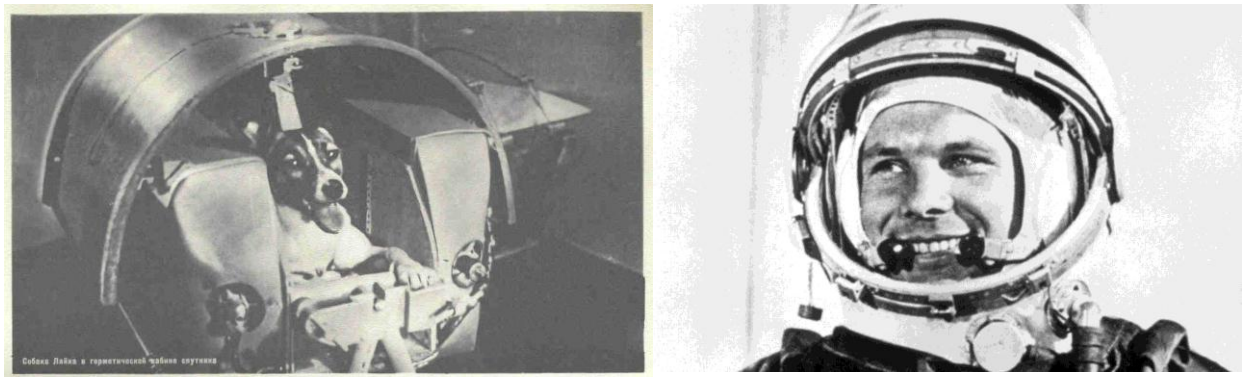


FIGURE 2 : LA CHIENNE LAIKA ET YOURI GAGARINE

Plusieurs groupes de développement de la NASA, de l'ESA, des Agences spatiales russe et chinoise ainsi que d'autres scientifiques étudient la faisabilité de projets de colonies spatiales en divers endroits du Système solaire. Ils ont mis en évidence des matières premières exploitables sur la Lune et sur les astéroïdes géocroiseurs, ou encore l'énergie solaire disponible en grande quantité. Toutefois, malgré le fait qu'aucune nouvelle découverte scientifique majeure ne soit nécessaire, il faudrait des prouesses techniques d'ingénierie, une meilleure connaissance de l'adaptation humaine à l'espace et surtout d'énormes moyens financiers pour concrétiser de tels projets.

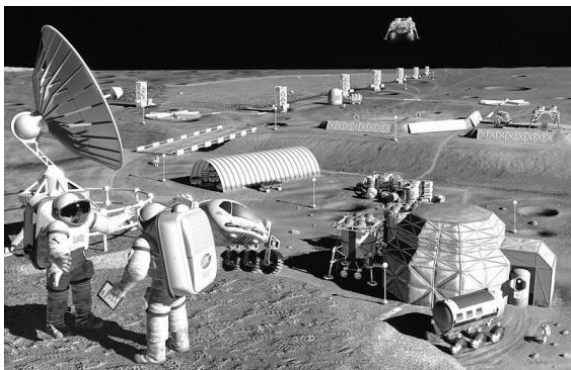


FIGURE 3 : BASE LUNAIRE

Vue d'artiste d'une colonie permettant l'extraction des ressources lunaires (fer, aluminium, magnésium et titane).

Pat Rawlings, Technical concepts for NASA's Exploration Office, Johnson Space Center (JSC).

La seule présence humaine permanente dans l'espace est actuellement celle de la station spatiale internationale, qui n'est cependant pas autonome. En 2008, l'unique projet avec un plan de financement était une base permanente de quatre astronautes sur la Lune (Figure 3) qui utiliserait des ressources locales. Il était prévu par la NASA pour 2024, mais son budget a été remis en question en 2010 par le Président Obama. L'ESA, ainsi que les agences spatiales russe, japonaise et chinoise projettent quant à elles d'établir un avant-poste sur la Lune après 2025. La colonisation de Mars est encore plus incertaine, la possibilité d'établir des bases humaines sur Mars étant actuellement en considération. D'autres scientifiques parlent même de bases sur Mercure ou Vénus.

1. LES EFFETS DE L'IMPESANTEUR SUR L'HOMME

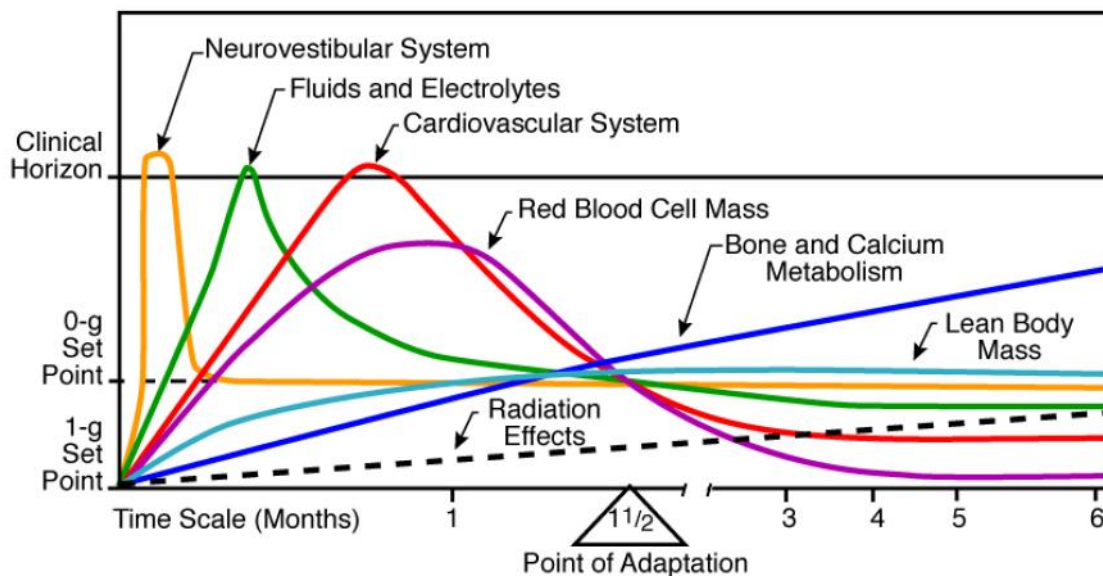


FIGURE 4 : CHANGEMENTS PHYSIOLOGIQUES DES DIFFERENTS SYSTEMES DE L'ORGANISME DURANT L'ADAPTATION A L'IMPESANTEUR (<http://asgsb.org/slidesets/slidesets.html>)

On appelle microgravité un point de l'espace où les forces de gravitation ont un effet très faible, soit parce qu'il se trouve très éloigné de tout corps massif, soit parce que les influences gravitationnelles de plusieurs corps massifs s'y compensent presque exactement. On emploie souvent le terme de microgravité à la place d'impesanteur. Ces notions sont pourtant très différentes : l'impesanteur dépend à la fois du mouvement du corps et du point de l'espace où il se trouve, alors que la microgravité ne dépend que du point où il se trouve. Un objet en chute libre ou en orbite autour de la Terre peut être en état d'impesanteur mais pas de microgravité.

Depuis que les hommes ont commencé à explorer l'espace, les effets de l'impesanteur sur l'organisme sont devenus un problème de santé important. Les vols spatiaux ont été utilisés pour étudier cet effet sur les systèmes vivants et sur le développement des organismes. Les missions Apollo ont été les premières à montrer des changements significatifs dans plusieurs systèmes biologiques. Ces changements ont d'abord montré des troubles vestibulaires et de l'arythmie cardiaque en vol, une tolérance orthostatique réduite et une déshydratation post-vol, ainsi qu'une perte de poids. Les scientifiques ont également constaté une diminution significative de la masse de globules rouges. Ensuite, d'autres changements majeurs ont été mis en évidence tels qu'une mauvaise régulation de l'azote pendant le vol et une perte importante de calcium et d'os (Criswell-Hudak 1991) (Figure 4). Ces observations ont guidé les scientifiques de la NASA dans la planification d'études métaboliques et immunitaires plus détaillées.

Les résultats ont montré que lors des vols spatiaux, le volume des membres inférieurs diminue de 10% en raison d'une translocation des fluides des jambes vers le haut du corps (1 à 2 L). C'est la raison pour laquelle les astronautes ont l'air d'avoir le visage bouffi et les membres inférieurs plus fins, syndrome appelé « puffy face - bird leg » (Williams et al. 2009). Ainsi, une diminution de 22% du volume plasmatique moyen est observé, par rapport aux données avant le vol, et ce dès deux jours de vol, même si l'équipage faisait en sorte de garder un état d'hydratation élevé. Après 8 jours de vol, il reste une diminution de 12% du volume plasmatique, et il faut 6 jours après l'atterrissage pour que ce

volume revienne à son niveau contrôle (Figure 5). La détection par l'organisme de cette translocation de fluides entraîne une augmentation de la diurèse qui peut expliquer la réduction du volume plasmatique (Leach, Cintrón, et Krauhs 1991).

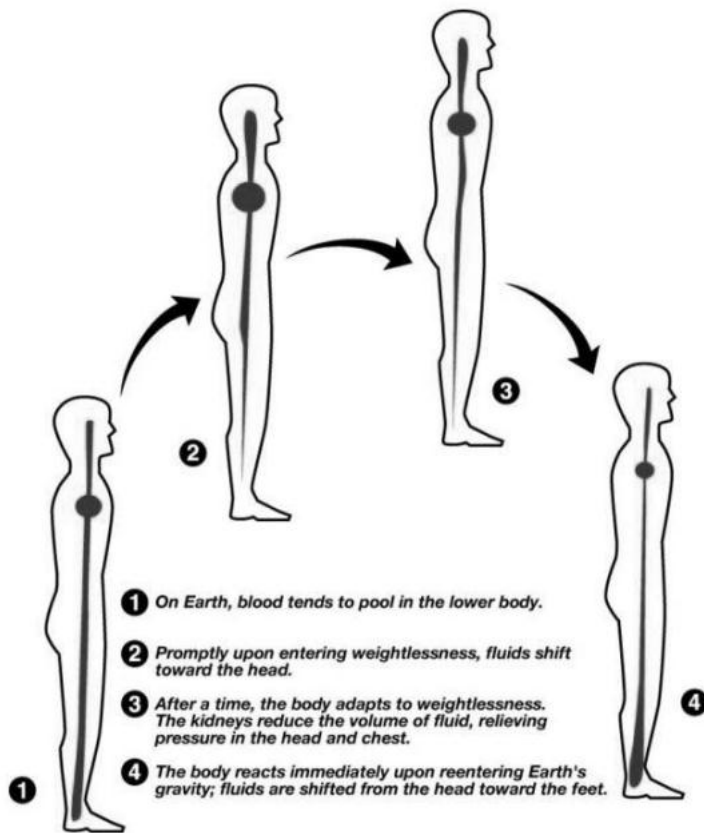


FIGURE 5 : TRANSLOCATION DES FLUIDES PENDANT LA PHASE D'ADAPTATION A L'IMPESANTEUR
(<http://asgsb.org/slidesets/slidesets.html>)

De plus, cette baisse du volume plasmatique entraîne une diminution de l'érythropoïétine (EPO). Cette réduction influence la dynamique de production et de destruction des érythrocytes chez l'homme et affecte diverses hormones. Les taux d'EPO sérique diminuent jusqu'à 40% dès deux jours de vol. Alfrey et coll. (Millie Hughes-Fulford 2011) ont aussi constaté une réduction dans la survie des globules rouges lors des vols spatiaux et expliquent ce phénomène par la réduction d'EPO sérique, qui entraîne l'apoptose des plus jeunes globules rouges circulants, appelés néocytes. Le processus est appelé néocytolyse et a été confirmé d'autres situations physiologiques comme lors de plongées en dessous du niveau de la mer ou d'anémie (L Rice et Alfrey 2000; Lawrence Rice et Alfrey 2005).

Ces changements majeurs, en plus de la mauvaise régulation de l'azote pendant le vol et de la perte importante de calcium et d'os observée (Criswell-Hudak 1991), indiquent que la gravité a des effets significatifs. Ces effets apparaissent sur les organismes entiers, touchant les organes et les tissus. Ils entraînent aussi une diminution de la masse musculaire, des dysfonctionnements cardiovasculaires, ainsi que de nombreux autres processus (G. Carmeliet, Vico, et Bouillon 2001; Fitts, Riley, et Widrick 2001; Fritsch-Yelle et al. 1996). Qu'en est-il pour une cellule isolée exposée à l'impesanteur ?

2. UNE CELLULE ISOLEE PEUT-ELLE ETRE AFFECTEE PAR L'IMPESANTEUR ? *Données théoriques*

La vie a toujours évoluée en survivant aux différents changements de son environnement (climat, habitat...). Un seul facteur est resté constant depuis les premières formes de vie : la force de gravité terrestre. Les processus biologiques ont du s'adapter à cette omniprésence de gravité, pour laquelle même une minuscule variation peut entraîner des impacts significatifs sur la vie et les fonctions de l'organisme.

Depuis que les hommes peuvent partir dans l'espace, nous avons vu que de nombreuses études ont montré que la perte de gravité avait des effets sur l'ensemble de l'organisme et sur chacun de ses organes et différents tissus (G. Carmeliet, Vico, et Bouillon 2001; Fitts, Riley, et Widrick 2001; Fritsch-Yelle et al. 1996).

Mais qu'en est-il d'une cellule isolée soumise à l'impesanteur ?

Il semble naturel de considérer une cellule seule comme point de départ d'un organisme vivant. Sur Terre, la gravité apparait comme un signal majeur de survie, amenant même Schneller et son équipe à dire que « *Stretching is good for a cell* » (Schneller, Vuori, et Ruoslahti 1997). Le stimulus directionnel assuré par la gravité terrestre joue un rôle important sur les cellules lors du développement d'un organisme modulant la biosynthèse, les échanges membranaires et la croissance des cellules.

En pratique, l'impesanteur n'induit pas de destruction des cellules. Quels sont les impacts qui peuvent être observés sur leur structure et leur physiologie ? Les effets ont été mis en évidence à des niveaux cellulaires et moléculaires, incluant des changements de morphologie (Rijken et al. 1991; M Hughes-Fulford 2003), des altérations de prolifération, de croissance ou de différenciation des cellules souches (Cogoli 2006; Grimm et al. 2011), des modifications d'expression de gènes (de Groot et al. 1991; Hammond et al. 1999; Yongqing Liu et Wang 2008) ou des changements dans les cascades de signalisations (de Groot et al. 1991; Ullrich, Huber, et Lang 2008). Les cellules indifférenciées semblent donc répondre à un changement de gravité mais les effets restent actuellement peu compris, et le fait qu'une seule cellule *in vitro* puisse réellement « sentir » ce changement reste controversé.

Le problème est de déterminer comment un mécanisme provenant d'un évènement physique et induisant donc une certaine perception de la force de gravité par les cellules, est traduit en processus biologiques. Alors que de nombreuses études mettent en évidence la réponse des cellules *in vitro* à des contraintes mécaniques, la façon dont les cellules « sentent » ces vibrations ou tensions est pour l'instant inconnue. La cellule posséderait des éléments structurels capables de jouer le rôle de « senseurs de la gravité », en évaluant l'intensité de la tension mécanique. Beaucoup de processus intracellulaires pourraient ainsi dépendre de la valeur de cette force de gravité.

Les cellules résistent à la gravité par des réactions en réponse au stress mécanique qu'elle induit, à savoir des forces intermoléculaires agissant contre la distortion produite par la gravité. En cas de chute libre, comme lors des vols orbitaux, tous les éléments de la cellule tombent en réponse exacte à la gravité (Figure 6). Il n'y a ainsi aucune distortion produite, aucun stress mécanique à l'intérieur de la cellule, et celle-ci est dite en impesanteur.

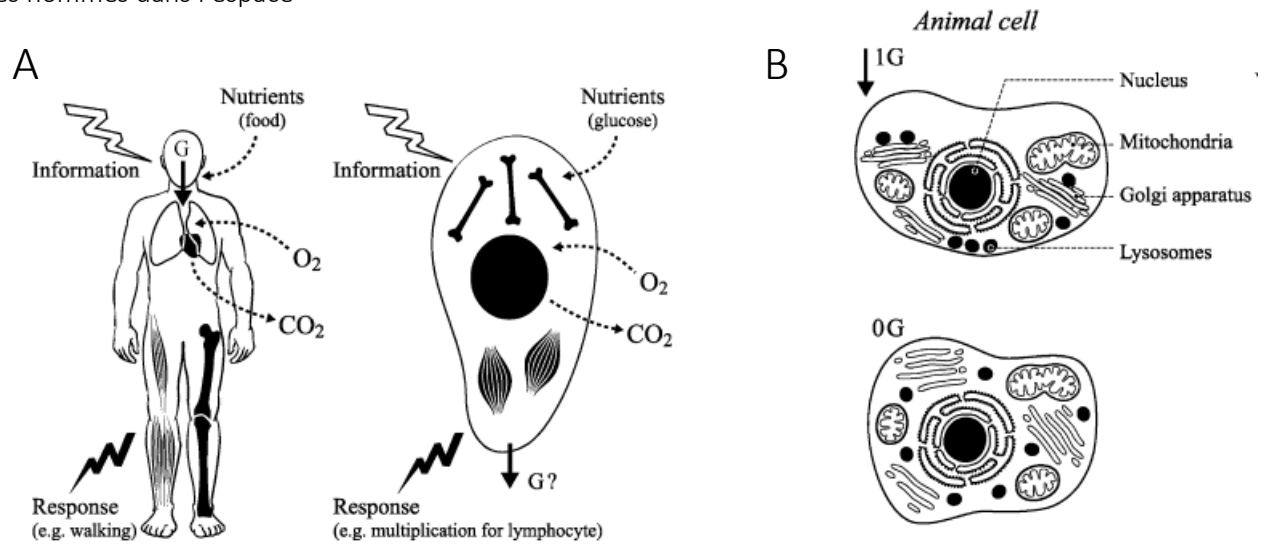


FIGURE 6 : COMPARAISON ORGANISME-CELLULES, SEDIMENTATION DES ORGANITES LIEE A LA GRAVITE

(A) Les processus biologiques au niveau de l'organisme ou au niveau d'une cellule sont finalement les mêmes (stimulus reçus et réponse par utilisation des nutriments et des échanges O₂-CO₂). (B) La gravité entraîne une sédimentation des organites cellulaires, qui se retrouvent équitablement répartis dans le cytoplasme en impesanteur. D'après (Clément 2011).

Peu d'études théoriques sur cette question ont été réalisées, et celles-ci considèrent en général que les forces impliquées sont trop faibles pour provoquer une réponse cellulaire à un changement d'environnement. Il est souvent admis que ces effets seraient plutôt causés par des variations au niveau des tissus ou des organes directement (D. Ingber 1999) et que ceux-ci seraient beaucoup plus forts et plus divers (Buravkova 2010).

Il semble en effet que ces effets indirects de l'impesanteur sont plus importants dans la hiérarchie des forces exercées sur une cellule. Par exemple, le poids que la Terre exerce sur une cellule est de l'ordre de 10^{-12} N, autant dire vraiment très faible. En comparaison, la force exercée par une cellule sur son substrat, grâce à son cytosquelette, est de l'ordre de 10^{-9} N (Delvoye et al. 1991). De plus, si on se focalise sur les effets directs attendus en réponse à la gravité terrestre, on retrouve un équilibre constant entre le mouvement aléatoire des molécules (ou mouvement Brownien) et l'organisation de la distribution des particules suivant la direction d'action de la gravité.

Que se passe-t-il en impesanteur ? Pollard nous explique qu'en cas de cellules vraiment petites (inférieures à 10 µm de diamètre), la combinaison du mouvement Brownien associé à n'importe quel changement de gravité entraîne toujours une distribution uniforme de tous les constituants cellulaires (Pollard 1965). De façon théorique, il apparaît difficile d'observer des effets dans ces systèmes. Un autre élément est la densité de distribution des éléments autour de la cellule qui peut être altérée par le manque de gravité, ceci étant dû à une perte de convection du milieu cellulaire. Selon Pollard, le maximum de différence statistique observable dans la densité des composants est inférieur à 0.001% (Pollard 1965). Autant dire qu'il paraît difficile qu'une cellule se développant dans un milieu où les nutriments arrivent tout autour d'elle, soit affectée par un changement de ce niveau.

En pratique, les expériences réalisées par l'Union Soviétique dans les années 70 avaient d'abord confirmé qu'il n'y avait pas de changement observé sur la structure et la physiologie des cellules en impesanteur (Sushkov et al. 1976). Ils ont finalement reconnu dans un second vol, une induction des mitoses pathologiques, un noyau qui apparaissait plus large et une réduction des capacités d'adhésion des cellules (Buravkova 2010).

Malgré des effets qui s'attendaient à être limités, l'impesanteur entraîne quand même des comportements différents des cellules comparés à des contrôles en gravité terrestre. Pollard fini par considérer que les effets de la gravité ne peuvent être significatifs que pour des cellules ayant un diamètre de plus de 10 μm , ce qui est justement le cas de nos cellules de mammifères, comparées aux bactéries qui, elles, sont trop petites !

Ces changements viendraient notamment du déplacement des composants intracellulaires (Beysens et al. 2011). Les cellules possèdent des organites définis tels que les mitochondries notamment pour lesquelles les calculs statistiques de Pollard montrent des différences plus fortes. Aussi, le manque de convection du milieu peut par contre altérer la fixation des ligands à leur récepteurs membranaires par exemple, ou entraîner l'accumulation des produits sécrétés, des déchets cellulaires ou de la chaleur et interagir avec la membrane des cellules. Ces effets restent toutefois à prendre en considération *in vitro* et ne s'appliquent pas *in vivo* du fait de la circulation continue des fluides dans l'espace intercellulaire. De même, les processus tels que les oscillations chimiques peuvent être altérées par le manque de convection (Fujieda et al. 1999). Des résultats montrent aussi des activités catalytiques des enzymes modifiées par l'impesanteur (Fujieda et al. 1999; Miele et al. 2003; Maccarrone et al. 2001), tandis que les processus moléculaires permettant la cristallisation des protéines sont induits (Terzyan et al. 2003; Vahedi-Faridi, Porta, et Borgstahl 2003). Par ailleurs, les systèmes de réaction-diffusion peuvent être altérés par des causes externes, dont la gravité, brisant la symétrie du processus. Or, la formation des microtubules par exemple suit ce processus.

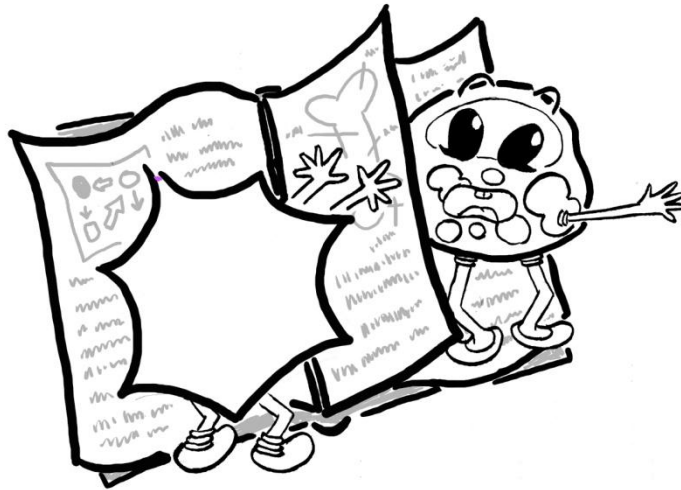
Tous ces mécanismes modulent les régulations paracrine/autocrine de la cellule, les signalisations intracellulaires ou les fonctions du cytosquelette montrant comment l'impesanteur peut altérer la forme des cellules, leur prolifération, leur survie ou leur différenciation.

Finalement, même une cellule isolée *in vitro* est impactée par l'impesanteur. Comment ressent-elle le changement de gravité ? Quels peuvent être les « senseurs » de la gravité au niveau cellulaire ?

La nature possède déjà des exemples de mécanorécepteurs définis chez les eucaryotes. Ce sont les statolithes dans les plantes et les otolithes de l'oreille interne dans la plupart des espèces de vertébrés. De plus, les cellules spécialisées des organes des sens peuvent détecter la pression (toucher) ou les vibrations, et communiquent ces stimulations physiques par les nerfs jusqu'au cerveau.

Les candidats les plus probables pour le rôle de « senseurs de gravité » sont les différents éléments du cytosquelette, le noyau, les organites intracellulaires ainsi que certains récepteurs de la surface cellulaire (intégrines), qui interagissent à la fois avec le cytosquelette et la matrice extracellulaire. Ces structures pourraient détecter les pressions et les déformations dans la matrice qui sont provoquées par une tension gravitationnelle ou mécanique, et provoquer une réponse cellulaire aux changements de gravité (Lambert, Lapière, et Nusgens 2007; D. E. Ingber 2003).

Nous avons proposé les protéines Rho de la famille des GTPases comme "senseurs" des changements de gravité. Etant au carrefour de nombreuses voies de signalisation et en amont des régulateurs du cytosquelette, ce sont d'excellentes candidates dont les détails sont donnés dans la revue (Voir Revue p.93).



REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A. LES DIFFERENTES CELLULES DE L'OS	16
A. 1. Les cellules souches squelettiques.....	17
A. 2. Les cellules du remaniement osseux	18
A. 3. Le tissu adipeux de la moelle osseuse	22
A. 4. Synthèse	25
B. L'EQUILIBRE OSTEO/ADIPOGENESE	26
B. 1. Le VEGF	27
B. 2. RhoGTPases et mécanotransduction	37
B. 3. La biologie des cellules souches squelettiques et le stress oxydant	56
C. LE STRONTIUM COMME CONTRE-MESURE DES EFFETS DE L'IMPESANTEUR	66
C. 1. Pertes osseuses sur terre et dans l'espace	67
C. 2. Le ranélate de strontium contre l'ostéoporose	71
C. 3. Les mécanismes cellulaires actuellement connus du strontium	72

A. LES DIFFERENTES CELLULES DE L'OS

Les os sont les éléments principaux du squelette. Ils structurent l'aspect extérieur de l'organisme et exercent d'importantes fonctions physiologiques : ils jouent un rôle de soutien structurel et mécanique (pour les organes mous), de base pour la protection des organes vitaux (encéphale moelle épinière), et ont un rôle primordial dans la réalisation des mouvements corporels (grâce à leur agencement avec les muscles squelettiques). Les os sont également des acteurs majeurs de l'homéostasie minérale (stockage régulé du calcium, du phosphore et de très nombreux facteurs de croissance) et le site privilégié de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse chez l'adulte.

Chaque os est constitué à l'extérieur d'une couche dense et lisse, l'os compact, à l'intérieur de laquelle se trouve l'os spongieux, une structure en nid d'abeille constituée de travées qui contiennent la moelle osseuse.

L'os compact contient des fibres de collagène qui présentent des orientations différentes conférant ainsi à la structure une résistance très importante aux forces de torsion que peuvent subir les os. L'os spongieux est beaucoup moins structuré que l'os compact, on y retrouve les éléments sanguins et de nombreuses cellules adipocytaires.

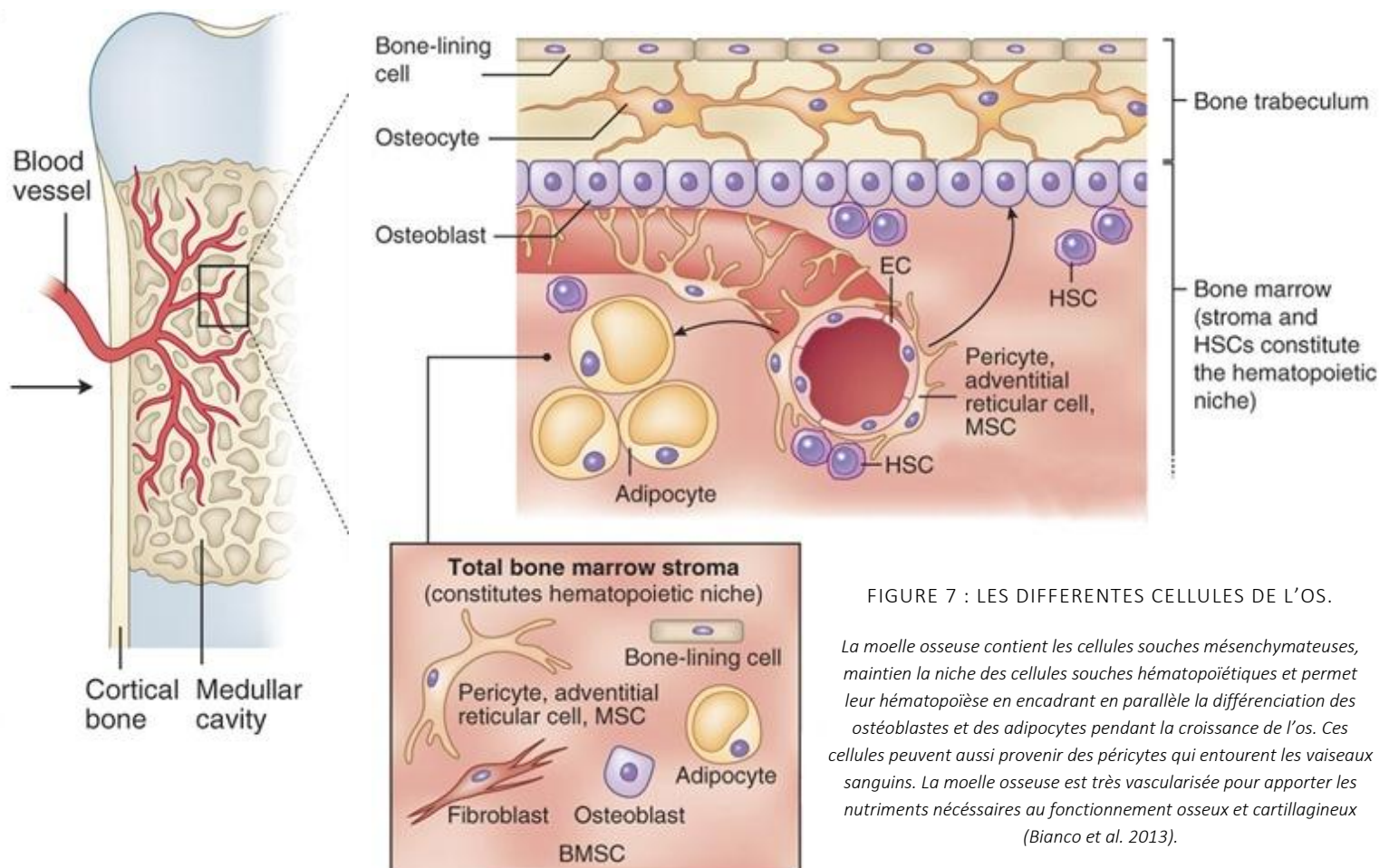


FIGURE 7 : LES DIFFERENTES CELLULES DE L'OS.

La moelle osseuse contient les cellules souches mésenchymateuses, maintient la niche des cellules souches hématopoïétiques et permet leur hématopoïèse en encadrant en parallèle la différenciation des ostéoblastes et des adipocytes pendant la croissance de l'os. Ces cellules peuvent aussi provenir des péricytes qui entourent les vaisseaux sanguins. La moelle osseuse est très vascularisée pour apporter les nutriments nécessaires au fonctionnement osseux et cartilagineux (Bianco et al. 2013).

L'os est recouvert d'une membrane externe qui le protège et dont la couche externe est composée de tissu fibreux (conjonctif) et la face interne (ostéogénique), en contact avec l'os compact, héberge les cellules assurant la croissance et le renouvellement osseux. L'ensemble de l'os est parcouru par un vaste réseau de capillaires sanguins qui apportent oxygène et nutriments (Figure 7).

Pendant l'enfance et l'adolescence, le squelette en croissance est façonné par le biais du processus de modelage. A l'âge adulte, l'os est soumis au processus de remodelage qui remplace l'os ancien et endommagé par de l'os nouveau. Ce processus est réalisé grâce à la balance entre les cellules ostéoformatrices, les ostéoblastes et les ostéocytes, et les cellules ostéorésorbantes que sont les ostéoclastes.

A. 1. LES CELLULES SOUCHES SQUELETTIQUES

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont depuis longtemps considérées comme étant les cellules souches permettant d'obtenir toutes les cellules associées au squelette, à savoir : les adipocytes, les ostéoblastes, les chondrocytes et les muscles squelettiques. Mais d'autres cellules souches existent dans la moelle osseuse : les périocytes. Ce sont des cellules localisées au niveau des capillaires, qu'elles entourent par de longs prolongements circonférentiels et cytoplasmiques. Bien que peu nombreux, les périocytes ont une fonction contractile et un rôle dans la régulation métabolique à travers la régulation du débit sanguin au niveau des capillaires et des veinules post-capillaires. Ces cellules périvasculaires se retrouvent dans tous les tissus, ne constituent pas une lignée distincte, et sont recrutées à la paroi des vaisseaux sanguins pendant le développement des organes et leur croissance. Leur implication dans la régénération de divers tissus a aussi été démontrée (Armulik, Genové, et Betsholtz 2011).

Les cellules souches mésenchymateuses sont caractérisées par deux propriétés spécifiques :

- **leur capacité à s'autorenouveler**, c'est à dire à se diviser en cellules identiques indéfiniment ou de manière prolongée afin d'assurer un stock permanent de cellules souches ;
- **leur degré de plasticité**, c'est à dire leur potentialité à se différencier en cellules matures fonctionnellement spécialisées composant un tissu donné. Ce processus se caractérise par un mode de division asymétrique aboutissant à la formation d'une cellule fille identique à la cellule mère et à une cellule fille différente.

Bien que la multipotence des MSC dérivées de la moelle osseuse soit reconnue depuis longtemps (M. Owen et Friedenstein 1988), leur capacité d'auto-renouvellement a seulement été montrée ces dernières années *in vivo* (Sacchetti et al. 2007; Méndez-Ferrer et al. 2010). Ainsi, lorsqu'elles sont transplantées, ces cellules ont la capacité de produire un os miniature avec une histologie et une architecture appropriées, et dans lequel l'hématopoïèse de l'animal receveur s'établit progressivement. En transplantation *in vivo*, ces MSC permettent de reformer toutes les cellules de l'os : cartilage, adipocytes, fibroblastes ainsi que le stroma, support de l'hématopoïèse.

Elles sont caractérisées par une morphologie de cellules adhérentes très étalées et par leur capacité à se différencier en plusieurs lignées mésenchymateuses grâce à des conditions *in vitro* contrôlées. Elles peuvent se répliquer en cellules indifférenciées et ont la capacité de se différencier en os, cartilage, tissu adipeux, muscles et stroma de la moelle (Pittenger et al. 1999).

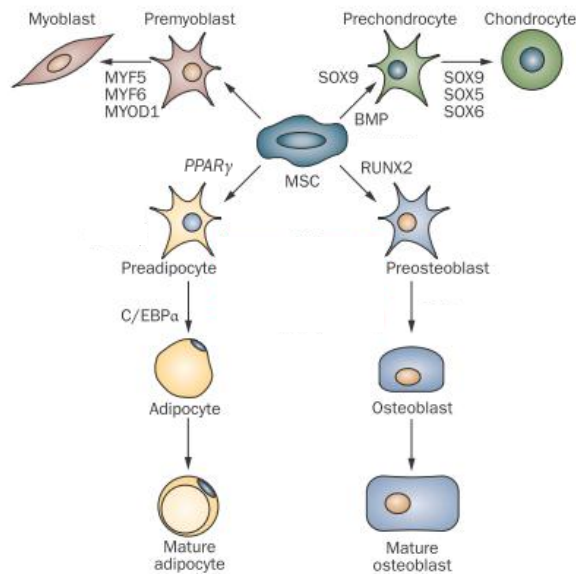


FIGURE 8 : LES DIFFÉRENTES DIFFÉRENCIATIONS POSSIBLES DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES (Takada, Kouzmenko, et Kato 2009).

De plus, un certain nombre d'études ont montrées qu'une large gamme de tissus extra-osseux pouvait être régénérée directement à partir des MSC, telles que les cellules hépatiques ou les neurones (Woodbury et al. 2000).

Les péricytes expriment les marqueurs moléculaires classiquement associés aux cellules souches mésenchymateuses, et leur sont semblables aussi bien sur le plan morphologique que fonctionnel. De plus, ils présentent un potentiel de différenciation en adipocytes, en ostéoblastes et en phagocytes, et sont donc aussi multipotents. Ils prolifèrent après une lésion osseuse et sont capables de synthétiser du collagène, des protéoglycanes et de l'ostéocalcine en intégrant le phosphate de calcium pour

produire une matrice extracellulaire permettant la réparation du tissu osseux (Crisan et al. 2008). Pour les distinguer des MSC, on peut les isoler grâce aux marqueurs spécifiques PDGFR β ⁺ (Récepteur β des facteurs de croissance des plaquettes), CD146⁺, et NG2⁺ (Crisan et al. 2008), tout en vérifiant en parallèle leur multipotence.

Ces deux types de cellules souches permettant d'obtenir les différentes cellules associées à l'os, et compte-tenu de leurs similarités morphologiques et de leurs capacités différencielles, Paolo Bianco propose de parler de cellules souches squelettiques (CSS), englobant à la fois les MSC et les péricytes (Bianco et al. 2013).

A. 2. LES CELLULES DU REMANIEMENT OSSEUX

2. 1) L'OS, UN TISSU ORGANIQUE ET MINÉRAL

L'os doit pouvoir supporter une charge et résister aux déformations, mais il doit aussi être suffisamment souple pour absorber l'énergie d'un choc mécanique, tout en restant assez léger pour faciliter le mouvement. Ces caractéristiques sont possibles grâce aux propriétés matricielles de l'os, une structure qui confère résistance aux forces de traction via la matrice et rigidité grâce aux sels minéraux. Les processus pathologiques qui produisent des anomalies dans la structure osseuse, telle l'ostéoporose, ou dans sa composition, entraînent un affaiblissement de la structure et peuvent occasionner des fractures.

Les constituants organiques de l'os sont d'une part les cellules qui le composent et, d'autre part, une importante matrice extracellulaire composée principalement de glycoprotéines, de fibres de collagène, et de substances sécrétées par les cellules. Les composants inorganiques de la matrice osseuse qui représentent 70% de sa masse sont des hydroxyapatites et des sels minéraux (calcium, phosphate, magnésium principalement) (Buckwalter et Cooper 1987).

La phase minérale de la matrice extra-cellulaire est minéralisée par les ostéoblastes en différenciation terminale, ainsi que par les chondrocytes hypertrophiques au niveau du front de calcification.

Les hydroxyapatites sont déposées parallèlement aux fibres de collagène, et la minéralisation est réalisée par l'intermédiaire de vésicules matricielles provenant des ostéoblastes ou des chondrocytes, ou avec nucléation primaire des cristaux en ajouts progressifs. Dans les deux cas, la nucléation secondaire est réalisée par la phosphatase alcaline.

L'os est donc une structure constituée d'un réseau cellulaire au sein d'une matrice extracellulaire et de sels minéraux. Les cellules retrouvées dans l'os sont principalement les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes.

2. 2) LES CELLULES OSTEOFORMATRICES

2) A) LES OSTEOBLASTES

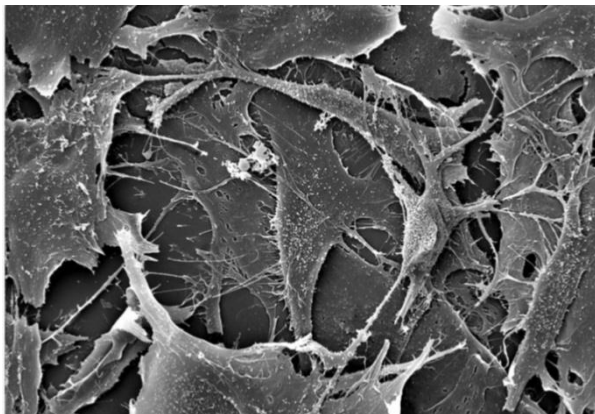


FIGURE 9 : OSTEOBLASTES OBSERVES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUES A TRANSMISSION Credit: José Almodóvar, University of Puerto Rico, Mayagüez Campus, Jeol USA, <http://www.jeolusa.com>

Les ostéoblastes, d'origine mésenchymateuse comme les adipocytes, sont responsables de la synthèse de la matrice osseuse dite non-minéralisée (ou ostéoïde) en sécrétant le collagène de type 1 pendant leur différenciation (Figure 9).

Ils jouent également un rôle essentiel dans la régulation de la minéralisation par le biais de la sécrétion de phosphatase alcaline sur la surface de minéralisation ou d'autres protéines telles que les SIBLINGs (Sialoprotéine osseuse (BSP)...), l'ostéocalcine ou l'ostéopontine... (T. A. Owen et al. 1990).

Le pré-ostéoblaste est une cellule de petite taille (10 à 20 μm) synthétisant seulement du collagène de type I et de la BSP. Un engagement plus poussé dans la voie ostéoblastique nécessite le maintien de l'expression du facteur transcriptionnel maître de cet engagement ostéoblastique : Runx2 (Runt-related transcription factor-2) (Ducy 2000), ainsi que l'expression d'Ostérix (Osx) (Nakashima et al. 2002), et divers composants de la voie de signalisation Wnt (Hu et al. 2005). Runx2 est régulé au niveau post-traductionnel puisqu'il est activé par sa phosphorylation (Xiao et al. 2000). Son invalidation chez la souris empêche toute ostéoblastogenèse (Karsenty et Wagner 2002).

Les ostéoblastes possèdent trois voies différentes de différenciation :

- soit ils finissent emmurés dans la matrice osseuse et deviennent des ostéocytes incorporés dans la matrice minéralisée ;
- soit ils deviennent inactifs et forment les cellules bordantes ;
- soit ils entrent en apoptose.

2) B) LES OSTEOCYTES

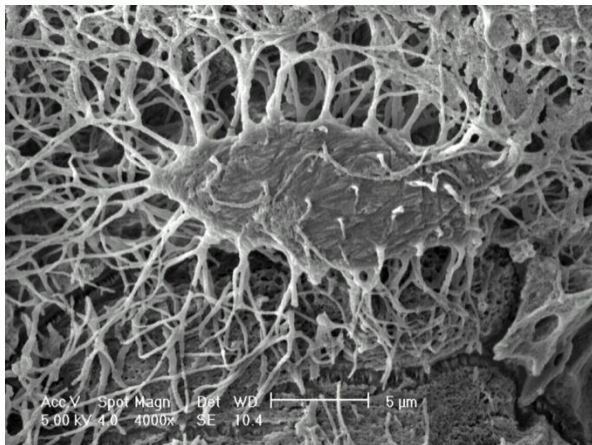


FIGURE 10 : OSTEOCYTES OBSERVES AU MICROSCOPE
ELECTRONIQUES A TRANSMISSION
Image par le Dr. Lynda Bonewald.

Les ostéocytes sont les cellules osseuses les plus abondantes dans l'os, elles représentent 95% de toutes les cellules osseuses. Elles communiquent entre elles et avec les autres cellules (cellules bordantes, ostéoblastes et ostéoclastes) par interdigitations formant un réseau dense de canaliculi dans la matrice osseuse. Ce réseau fonctionnel permet de détecter les tensions mécaniques appliquées sur les os et de sécréter les différents facteurs qui vont activer ou inhiber les ostéoblastes entre eux, les cellules bordantes ou les ostéoclastes.

Ces senseurs du stress mécanique sont donc importants pour le maintien de la structure

osseuse en détectant aussi les micro-lésions et en coordonnant un remodelage osseux ciblé (Clarke 2008).

Les ostéocytes sont issus de la maturation des ostéoblastes. Ils ont une durée de vie pouvant aller jusqu'à 50 ans, sont totalement entourés par la matrice osseuse et peuvent atteindre 30 μm de long pour 15 μm de large. Les ostéocytes, contrairement aux ostéoblastes, ont une activité phosphatase alcaline faible. Ils expriment cependant une grande quantité d'ostéocalcine et quelques protéines de la matrice cellulaire qui sont impliquées dans l'établissement d'extensions cellulaires. Parmi les marqueurs des ostéocytes, on peut retrouver DMP-1 (Phosphoprotéine matricielle dentinaire-1) et FGF23 (Facteur 23 de croissance du fibroblaste). Ils sécrètent des protéines qui vont avoir un rôle important dans le remodelage osseux. La sclérostine inhibe la formation tandis que le RANK-L (receptor activator NF-kappa B ligand) active les ostéoclastes et donc la résorption osseuse (Clarke 2008; Xiong et O'Brien 2012).

2. 3) LES CELLULES OSTEORESORBANTES

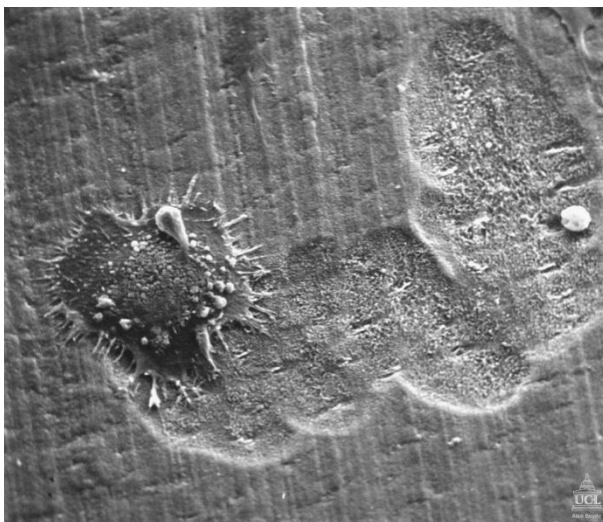


FIGURE 11 : OSTEOCLASTE OBSERVE AU MICROSCOPE
ELECTRONIQUE A TRANSMISSION
http://www.brsoc.org.uk/gallery/boyde_bfast.jpg

Les ostéoclastes sont des cellules volumineuses (50 à 100 μm), polynucléaires (jusqu'à 30 noyaux), dont leurs précurseurs, circulant dans le sang et la moelle osseuse, sont dérivées de la lignée des monocytes/macrophages. Ils sont formés par fusion de précurseurs et sont activés lorsque les ligands RANK-L se lient sur les récepteurs RANK. La formation et l'activation des ostéoclastes dépend des cytokines locales, tels que M-CSF (macrophage-colony stimulating factor), RANKL et OPG (Ostéoprotégérine), qui sont produits par les ostéoblastes et d'autres cellules de la moelle osseuse. Les OPG sont des récepteurs pouvant se lier aux RANK-L et donc limiter leur action.

Les différentes cellules de l'os

Les ostéoclastes se fixent à la surface de l'os et le résorbent par formation d'un compartiment étanche, suivie de la sécrétion d'acide chlorhydrique et d'enzymes qui vont dégrader le collagène et l'os. Ils entrent ensuite en apoptose (Raisz 2005).

2. 4) SYNTHÈSE

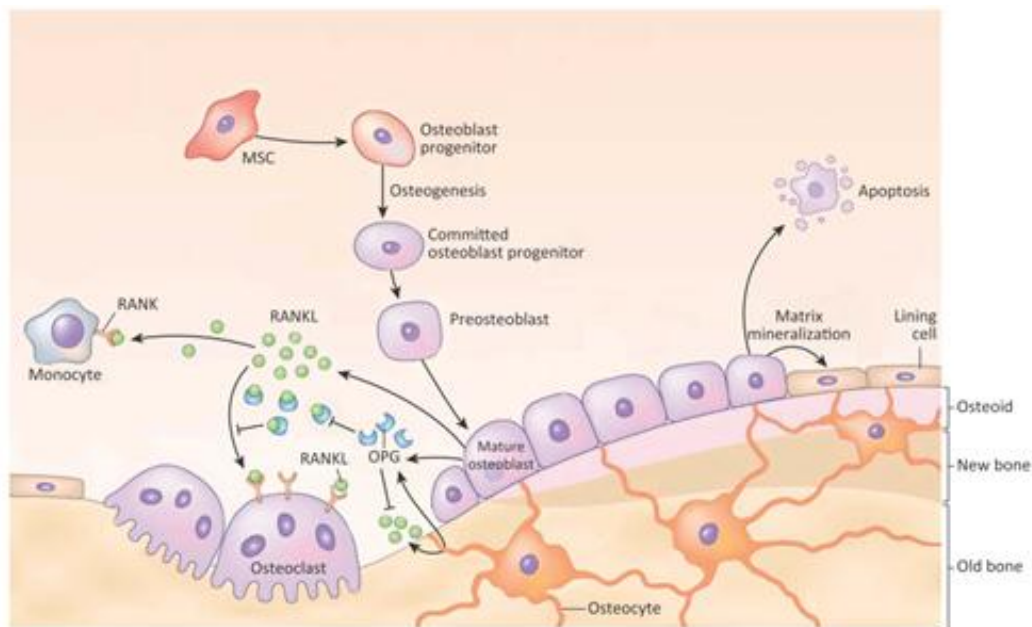


FIGURE 12 : LE PROCESSUS DE FORMATION OSSEUSE (BOSE ET AL. 2013)

L'os doit pouvoir entretenir continuellement une structure lui permettant de fournir le calcium et phosphate nécessaire au métabolisme, de résister aux déformations, tout en étant suffisamment souple et léger pour faciliter le mouvement. Pour cela, sa moelle osseuse contient des cellules souches squelettiques considérées comme permettant d'obtenir toutes les cellules associées au squelette, à savoir : les adipocytes, les ostéoblastes ou encore les muscles squelettiques.

C'est l'interconnection de ces différents types cellulaires (ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes) qui permet à l'os de maintenir sa structure et ses fonctions. L'ostéoblastogénèse chez les CSS se produit par l'activation du facteur de transcription Runx2, les ostéocytes proviennent de la différenciation terminale des ostéoblastes, et les ostéoclastes sont activés grâce au RANK-L sécrété par les ostéoblastes ou les ostéocytes, ou inactivés par l'OPG aussi sécrété par les ostéoblastes. L'ostéoblaste possède donc un rôle clé dans le maintien et le remaniement de l'os et de ses cellules (Figure 12).

A. 3. LE TISSU ADIPEUX DE LA MOELLE OSSEUSE

3. 1) LES DIFFERENTS TISSUS ADIPEUX

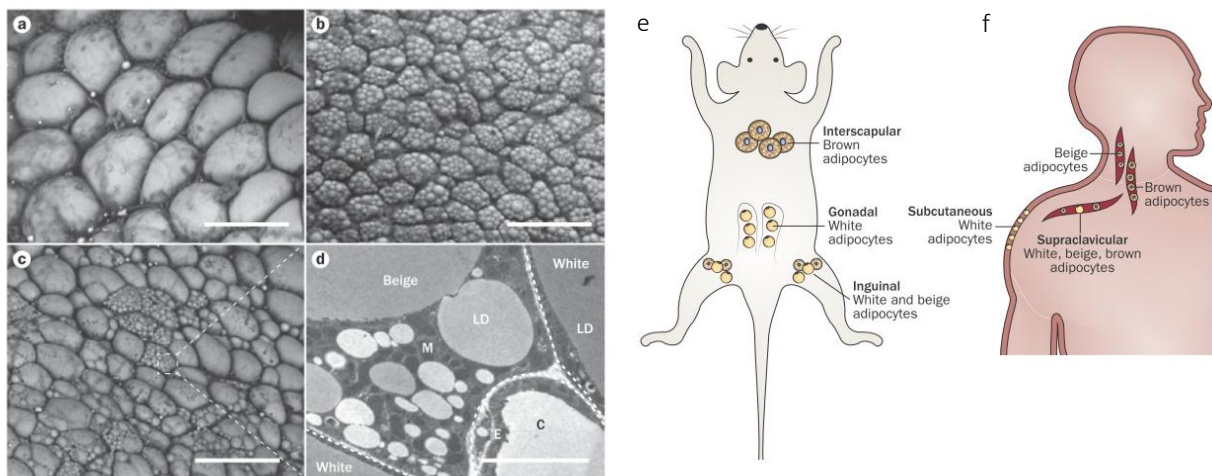


FIGURE 13 : LES DIFFERENTS TISSUS ADIPEUX.

Microscopie électronique à balayage environnemental d'adipocytes blancs (a), bruns (b) et beiges (c). Adipocytes beiges au microscope électronique à transmission, montrant les nombreuses mitochondries (d) (C : capillaire, E : cellule endothéliale, LD : vésicule lipidique, M : mitochondrie). Barres d'échelle a-c : 50µm, d : 5µm. Sites anatomiques des adipocytes blancs, bruns et beiges chez la souris (e) et chez l'homme (f). D'après (Bartelt et Heeren 2014).

Deux grands types de tissus adipeux sont présents chez les mammifères : le blanc et le brun (Figure 13). Ces deux tissus ont des propriétés biochimiques et fonctionnelles distinctes. Les adipocytes ont un diamètre pouvant aller de 20 µm (adipocytes bruns) à des diamètres plus élevés de 150-180 µm (adipocytes blancs). Le tissu adipeux brun se retrouve surtout chez les rongeurs. Chez l'homme, il est initialement présent chez le nouveau-né et joue un rôle clé dans la gestion de la thermogenèse (libération d'énergie sous forme de chaleur). Cette thermogenèse est accomplie par phosphorylation des acides gras dans les nombreuses mitochondries, par l'activation d'une protéine de découplage UCP1 (Protéine découplante 1), laquelle permet d'utiliser l'énergie générée pour la thermorégulation. Le tissu adipeux blanc constitue la principale réserve d'énergie de l'organisme et représente la vaste majorité du tissu adipeux. L'apparence blanche de ce tissu résulte du nombre plus faible de mitochondries dans les adipocytes. Ils assurent la fonction métabolique du tissu (stockage et dégradation des triglycérides) mais ont aussi des fonctions endocrines (Casteilla et Dani 2006). Au cours de ces dernières années, les recherches établies ont permis de faire émerger les concepts et rôles clés du tissu adipeux dans le contrôle des flux métaboliques ainsi que cette notion de tissu adipeux endocrine. Ainsi, il n'est plus décrit comme un simple tissu de soutien et de protection. Les acides gras libres, issus de la lipolyse et libérés dans la circulation sanguine, représentent le principal produit de sécrétion du tissu adipeux (265). Cependant, il est également capable de synthétiser et de sécréter une multitude de facteurs qui agissent soit localement de façon autocrine et/ou paracrine, soit parfois de façon endocrine. Ces facteurs bioactifs produits et sécrétés sont désignés sous le terme « adipokines ». Ces médiateurs ont un impact sur de nombreux tissus cibles, comme le foie ou les muscles squelettiques, et participent directement au contrôle général de la balance énergétique.

En plus des adipocytes blancs et bruns, connus depuis de nombreuses années, une catégorie intermédiaire, les adipocytes beiges, a été récemment découverte. Ces adipocytes ont la même fonction que les cellules brunes (la thermogénèse) mais sont présents chez les adultes et n'ont pas la même origine. Ils se retrouvent au sein du tissu adipeux blanc et proviennent de la transdifférenciation des adipocytes blancs en phénotype plutôt « brun » (Figure 14).

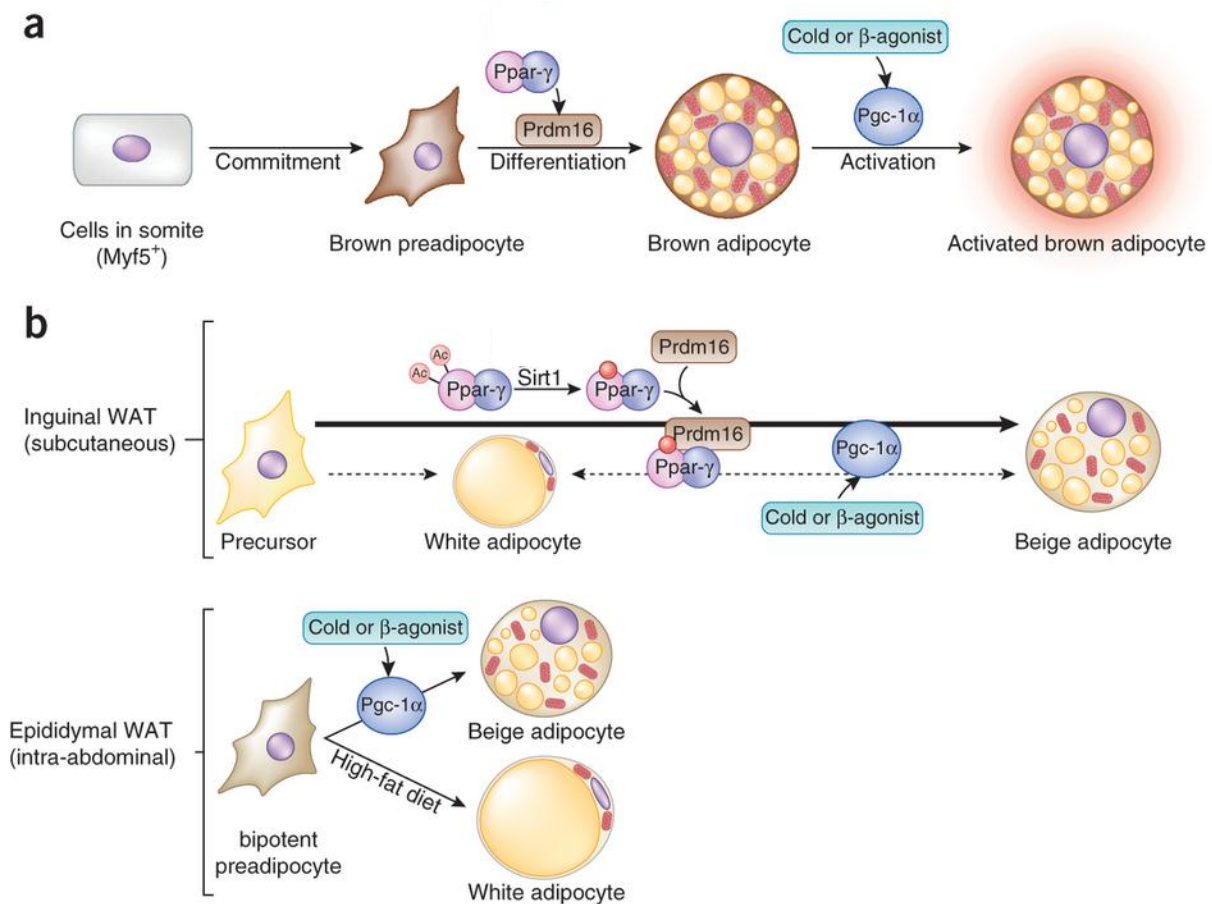


FIGURE 14 : PROCESSUS DE DIFFÉRENCIATION DES DIFFÉRENTS TISSUS ADIPEUX (Harms et Seale 2013)

Mais la découverte d'autres tissus adipeux ne s'arrête pas là ! Cette année a été mise en évidence par l'équipe de Giordano, des adipocytes dit « roses » apparaissant chez les souris gestantes et en période de lactation. Ils font partie des cellules composant les glandes mammaires et sécrèteraient des protéines du lait. Différentes preuves suggèrent qu'ils dérivent de la transdifférenciation des adipocytes blancs sous-cutanés des glandes mammaires (Giordano et al. 2014). Les adipocytes roses sécrètent également de la leptine, en plus des constituants du lait, qui semble avoir un rôle important dans la prévention de l'obésité chez le nourrisson (Palou, Sánchez, et Picó 2009).

3. 2) LES ADIPOCYTES JAUNES OU ADIPOCYTES MEDULLAIRES

Une dernière catégorie de tissu adipeux existant au sein de l'organisme, nous a particulièrement intéressés, ce sont les adipocytes jaunes. Ils sont situés dans la moelle osseuse, proviennent des mêmes précurseurs mésenchymateux que les ostéoblastes, et sont aussi appelés adipocytes médullaires (Krings et al. 2012). L'aspect des adipocytes de la moelle osseuse jaune diffère de celui des adipocytes du tissu adipeux blanc ou brun. D'un point de vue macroscopique, ils sont de couleur jaune

en raison de la présence relativement importante de mitochondries, similaire à celle des adipocytes beiges. La taille des adipocytes jaune dépend principalement de leur contenu en lipides et elle est inférieure à celle des adipocytes blanc. Les adipocytes médullaires sont ainsi relativement similaires aux adipocytes extramédullaires, mais s'en distinguent par leur forte activité estérasique (Lecka-Czernik 2012). Initialement décrits comme éléments architecturaux au sein de la moelle osseuse, le rôle fondamental de la moelle osseuse jaune est désormais admis, même s'il reste encore incomplètement élucidé (J M Gimble 1990). Ce tissu n'est plus assimilé à un simple « remplissage » du vide présent au sein de l'os spongieux.

Dans les cavités osseuses de l'homme adulte en condition physiologique, les adipocytes constituent les cellules les plus abondantes du micro-environnement médullaire. Avec le vieillissement, les cellules adipeuses, jointives, peuvent occuper jusqu'à 90% de l'espace médullaire des os longs des membres (Fève et al. 1998). La moelle osseuse jaune possède des propriétés originales, dont certaines lui permettent de jouer un rôle non négligeable dans la prolifération et l'hématopoïèse (Laharrague et al. 1999), étant en contact étroit avec les cellules hématopoïétiques, à tous les stades de différenciation. De nombreuses études confirment aussi son implication dans l'ostéogenèse, le tissu adipeux jaune ayant un rôle négatif sur la masse osseuse. Certaines adipokines, en particulier la leptine et l'adiponectine, sont produites par les adipocytes médullaires, mais en petites quantités en comparaison avec le tissu adipeux blanc (Krings et al. 2012). Ces adipokines semblent participer à la régulation du microenvironnement de la moelle osseuse et auront tendance à inhiber l'ostéoblastogénèse et à induire l'ostéoclastogénèse (Motyl et Rosen 2011; Krings et al. 2012). Dans l'ostéoporose par exemple, l'augmentation du tissu adipeux médullaire est parallèle à la diminution du volume osseux (Sheu et Cauley 2011). De plus, il a été démontré que la diminution de l'activité du facteur de transcription contrôlant l'adipogénèse : le récepteur γ de la prolifération du péroxysome activé (PPAR γ), favorisait l'augmentation de la masse osseuse (Akune et al. 2004). Cependant, le rôle exact des adipocytes médullaires dans la physiologie osseuse n'est pas clair puisque chez certains modèles de rats souffrant d'un manque d'adipocytes, ceux-ci possèdent cependant une masse osseuse normale (Justesen et al. 2004).

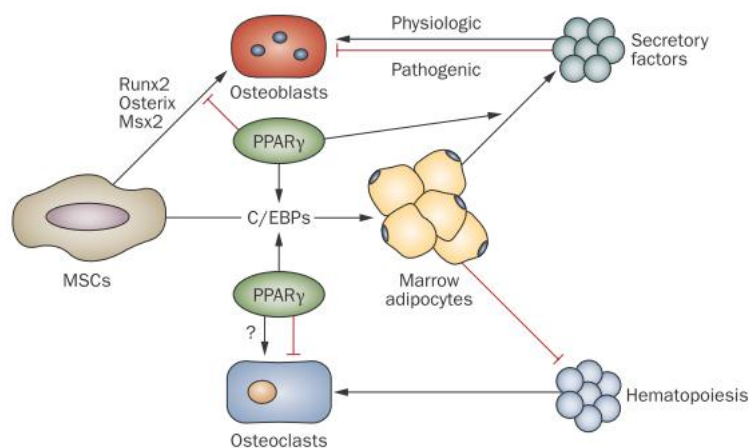


FIGURE 15 : ADIPOCYTES ET REMODELAGE OSSEUX (Kawai et Rosen 2010)

Le processus d'engagement de ces adipocytes est le même que pour les adipocytes blancs. Il requiert le recrutement des cellules souches squelettiques, la présence de multiples facteurs de croissance et l'activation de facteurs de transcription de protéines spécifiques. Les facteurs clé de cette

transcription de protéines sont PPAR γ et C/EBP α (C/EBP α appartient à la famille des facteurs de transcription C/EBP « CCCAT/Enhancer binding Protein »). PPAR γ induit C/EBP α qui, à son tour, augmente l'expression de PPAR γ (Kawai et Rosen 2010). L'activation du PPAR γ régule positivement la différenciation des adipocytes en se comportant comme un régulateur négatif de la différenciation ostéogénique (Rosen et al. 2009).

Les adipocytes médullaires peuvent être considérés comme des réserves de précurseurs ou d'énergie utilisables lors de la prolifération et la différenciation des précurseurs hématopoïétiques. De plus, l'activité métabolique de ces adipocytes jaunes apparaît très importante, bien plus élevée par exemple que celle des adipocytes des tissus sous-cutanés (Cioffi et al. 1996).

A. 4. SYNTHÈSE

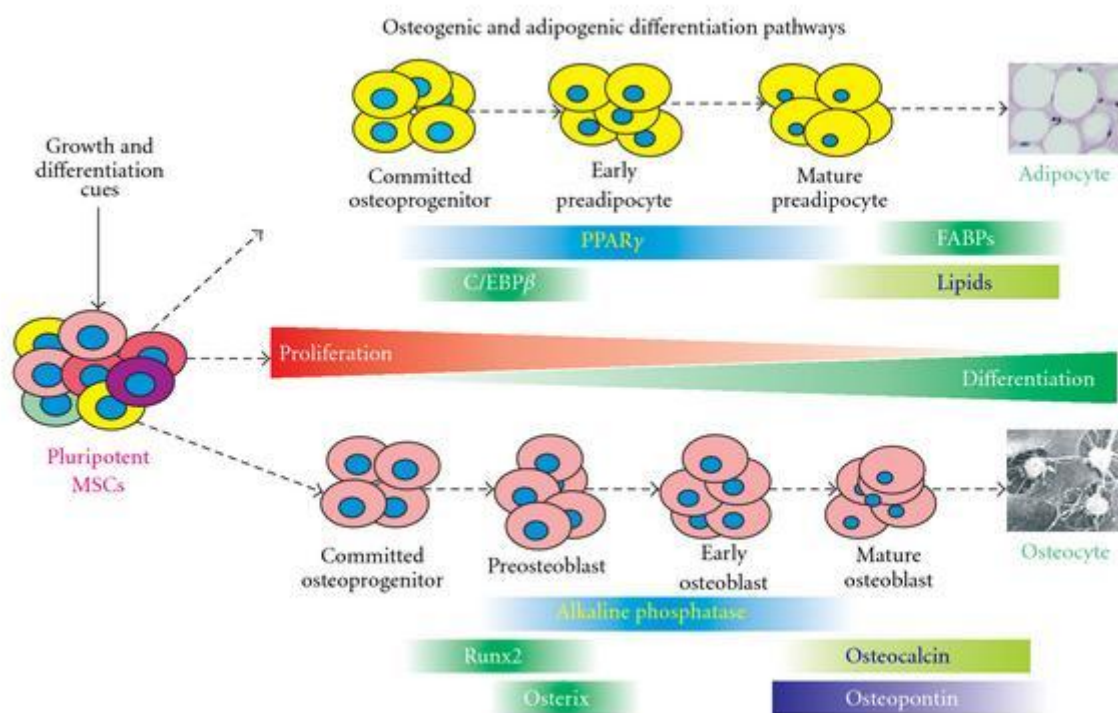


FIGURE 16 : VOIES OSTEOGENIQUE ET ADIPOCYTAIRE DE DIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES (Wagner et al. 2010).

Les deux types de cellules ostéogéniques et adipocytaires se différencient à partir des mêmes précurseurs que sont les cellules souches squelettiques. Cette différenciation en fonction de la lignée comporte plusieurs stades pour passer progressivement d'un statut prolifératif à un statut différenciant (Figure 16).

Ces deux types cellulaires provenant du même progéniteur, l'équilibre permettant de diriger l'engagement entre ostéoblastes et adipocytes est très fortement régulée, et certaines régulations ne sont pas encore complètement connues, un seul évènement pouvant l'orienter plutôt vers une voie qu'une autre. Ces évènements jouant sur l'engagement des cellules souches squelettiques sont détaillés dans la partie suivante.

B. L'EQUILIBRE OSTEO/ADIPOGENESE

Au sein de la moelle osseuse, la différenciation des cellules souches squelettiques en adipocytes ou en ostéoblastes est régulée de manière compétitive, les mécanismes favorisant la formation d'une cellule inhibent ceux qui induisent l'autre lignée. Cette balance est régulée par de nombreux facteurs (Figure 17) :

- **les facteurs de transcription Runx2 et PPAR γ .** PPAR γ a un rôle négatif sur l'expression et la transactivation de RUNX2, et une surexpression de Runx2 inhibe aussi l'expression de PPAR γ et l'adipogénèse (X Zhang et al. 2006; James 2013). En fait, une boucle de régulation existe entre PPAR γ et RUNX2 qui interagissent ensemble physiquement *in vitro* et *in vivo* ce qui perturbe la liaison de RUNX2 sur le promoteur de l'OCN (Ostéocalcine) par exemple et explique ainsi la diminution de l'expression de l'OCN lorsque PPAR γ est activé (Jeon et al. 2003).
- **des facteurs hormonaux :** les œstrogènes qui diminuent l'adiposité de la moelle osseuse (Elbaz, Rivas, et Duque 2009) ; l'insuline qui permet l'entrée du glucose dans la cellule qui sera ensuite converti en triglycérides aboutissant ainsi à l'accumulation de lipides dans l'adipocyte mature ; ou les glucocorticoïdes qui inhibent la différenciation des ostéoblastes (Canalis 2005). Aussi, la parathormone (PTH) intermittente stimule l'ostéoblastogenèse en augmentant l'expression d'Osx et en réprimant celle de PPAR γ (Rickard et al. 2006; B. L. Wang et al. 2006; Prisby et al. 2011).
- **des hormones digestives et des facteurs de nutrition :** la leptine, qui inhibe *in vitro* l'adipogénèse ; la ghréline qui la favorise ; ou encore la privation en nourriture qui augmente l'adiposité de la moelle osseuse (Aguiari et al. 2008; Devlin et al. 2010), ainsi que la vitamine D qui régule l'ostéoblastogenèse (van Driel et van Leeuwen 2014).
- **la signalisation Wnt/ β -Caténine,** qui favorise le renouvellement des CSS, l'induction de l'ostéoblastogenèse, la répression de l'adipogénèse ainsi que l'inhibition de l'apoptose des ostéoblastes et des ostéocytes (Krishnan, Bryant, et Macdougald 2006).
- **le VEGF :** sa signalisation peut orienter l'engagement des CSS, selon qu'il soit au noyau ou cytoplasmique (Yanqiu Liu et al. 2012). De plus, il est mécanosensible (Faure et al. 2008; Dumas et al. 2009) et ses isoformes peuvent différer en fonction de l'orientation choisi (Hovey et al. 2001; Maes et al. 2004).
- **les RhoGTPases.** RhoA (Membre homologue A de la famille de gènes de Ras) a été montré comme favorisant l'ostéogénèse tandis qu'il inhibe l'adipogénèse (Sordella et al. 2003), et Rac1 (Ras-regulated C3 botulinum toxin substrate) induit la production d'espèces réactives de l'oxygène induisant l'engagement adipocytaire (Maack et al. 2003).
- **les contraintes mécaniques.** La charge mécanique induit l'ostéogénèse et diminue l'adipogénèse (David et al. 2007). Au contraire, l'absence de contrainte mécanique, comme c'est le cas lors des vols spatiaux, induit l'adipogénèse et inhibe l'ostéogénèse (Voir Revue p.93).
- **le stress oxydatif dû au vieillissement,** qui sera détaillé plus loin. Les radicaux libres de l'oxygène augmentent l'adipogénèse et ont un effet négatif sur l'ostéogénèse (Santiago-Mora et al. 2011; Almeida et al. 2009). PPAR γ , qui joue un rôle clé dans la transcription adipogénique, est impliqué dans la protection contre le stress oxydatif (Okuno et al. 2008).

Dans cette partie, nous allons détailler ces quatre derniers points, cruciaux dans l'équilibre ostéo/adipogénèse.

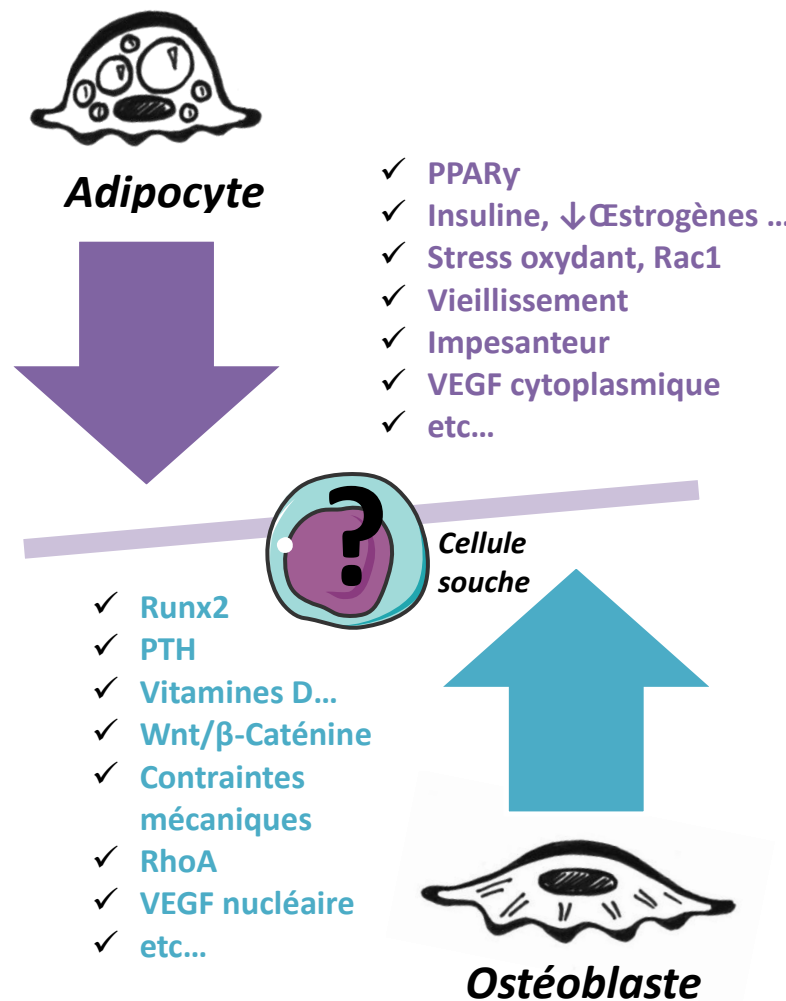


FIGURE 17 : LES FACTEURS INFLUENÇANT L'EQUILIBRE ENTRE ADIPO ET OSTEOGENESE

B. 1. LE VEGF

La famille des VEGF (facteurs de croissance vasculaire endothéliale) comprend six membres, que sont le VEGF-A, le PlGF, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D et le VEGF-F. Ce sont des glycoprotéines homodimériques qui jouent un rôle critique dans la vasculogénèse et l'angiogénèse (Holmes et al. 2007). Les membres de cette famille se distinguent par leurs propriétés biologiques et physiologiques, ainsi que leurs affinités à leurs récepteurs VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3, ainsi que leurs co-récepteurs comme les protéoglycanes à héparane sulfate et les neuropilines (Berendsen et Olsen 2013).

Beaucoup de types cellulaires expriment le VEGF-A (ou VEGF). Ces dernières années, plusieurs études ont mis progressivement en évidence le fait qu'il pouvait avoir d'autres rôles, tout aussi importants, notamment dans la survie cellulaire durant le développement des os et du cartilage. Contrairement aux fonctions paracrine habituellement attribuées au VEGF pour le développement vasculaire et l'angiogénèse, dans le cas de la survie des cellules endothéliales (W. Li et Keller 2000),

hématopoïétiques (Gerber et al. 2002) ou tumorales (Samuel et al. 2011), c'est une signalisation intracrine ou autocrine qui caractérise son action (Berendsen et Olsen 2013).

Les différentes fonctions du VEGF dans le développement et la maintenance du tissu osseux ne sont pas encore complètement comprises. Dans l'os, les ostéoblastes sécrètent du VEGF et expriment ses récepteurs (Deckers et al. 2013). De même, les ostéoclastes expriment les récepteurs du VEGF, et ce dernier permet leur recrutement chimiotactique aux zones de remodelage (Tombran-Tink et Barnstable 2004). Bien que l'action ostéogénique du VEGF reste floue, il a été montré comme favorisant la différenciation ostéoblastique (Hiltunen et al. 2003; Midy et Plouet 1994; Zelzer et al. 2002). Le VEGF peut également servir à compléter et potentialiser la fonction ostéogénique d'autres facteurs de croissance (Eckardt et al. 2005). Par exemple, les BMP exercent leurs actions vasculogéniques via la production ostéoblastique de VEGF (Deckers et al. 2002).

1. 1) LES ISOFORMES DU VEGF-A

Chez la souris, le gène VEGF-A est constitué de 8 exons. L'expression de ce gène conduit à la synthèse de neuf isoformes (actuellement identifiées) dont la taille varie entre 110 et 205 acides aminés chez la souris (un de moins que les isoformes humaines) (Figure 18). La plupart des cellules expriment préférentiellement les isoformes de 120, 144, 164 et 188, le VEGF-164 étant l'isoforme majoritaire (Poltorak et al. 1997). L'affinité à la matrice extracellulaire varie en fonction des isoformes, par conséquent la diffusibilité aussi. Chaque isoforme possède la séquence codée par l'exon 3, qui régule la formation covalente de dimères et la liaison au VEGFR1 (ou Flt-1), ainsi que l'exon 4, qui lui permet la liaison au VEGFR2 (Flk-1 ou KDR). Les exons 6 et 7 codent pour les domaines de liaison héparines, et n'apparaissent pas chez le VEGF120, tandis que seulement l'exon 6 est manquant dans le VEGF164. Le VEGF 120 ne possédant pas les exons 6 et 7 est donc le plus diffusible et est dit « soluble », tandis que le 188 est appelé « matriciel ». Le VEGF 164 est à la fois diffusible et/ou lié aux composants de la matrice extracellulaire. Le VEGF 120 est relargué sous forme soluble par les cellules productrices alors que 50 à 70% du VEGF 164 reste associé à la matrice extra-cellulaire (MEC) par des interactions HSPG (heparan sulfate proteoglycan) (Houck et al. 1992). Les VEGF188 et 205 sont complètement séquestrés dans la MEC tout autour de la surface cellulaire (Houck et al. 1992). L'exon 6 du VEGF permet la liaison aux HSPGs de la matrice extracellulaire, mais aussi au collagène, ou à la fibronectine (T. T. Chen et al. 2010).

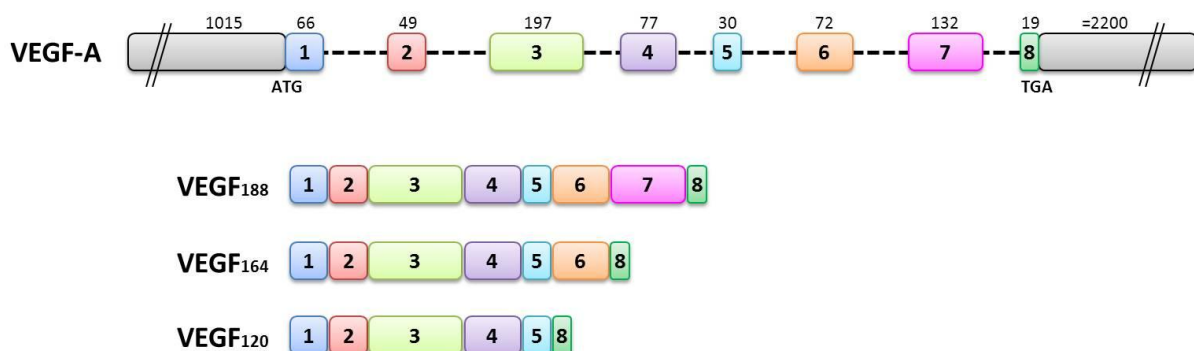


FIGURE 18 : EPISSAGE ALTERNATIF DU VEGF-A
D'après les données de (Poltorak et al. 1997)

La régulation de l'expression du VEGF est principalement transcriptionnelle mais elle se fait également par la stabilisation de ses ARNm (Dibbens et al. 1999).

Chez l'adulte, les tissus adipeux sont les tissus qui expriment le plus fortement le VEGF, suivis des poumons ou des ovaires. Les reins, les muscles ou le coeur ont une expression moyenne de VEGF, et le foie ou le cerveau une production faible. Le VEGF semble être plus exprimé dans les tissus nécessitant une forte angiogénèse ou une perméabilité basale (Ng 2008).

Les organes expriment des ratios différents d'isoformes du VEGF qui permettent d'adapter le réseau vasculaire aux besoins spécifiques de chaque tissu (Figure 19). Ainsi, les souris n'exprimant que du VEGF 120 ont des problèmes de développement cardiaques et pulmonaires dûs à des défauts d'angiogénèse. Au contraire, la croissance des tumeurs est accélérée si elles expriment du VEGF 164 (Ng 2008).

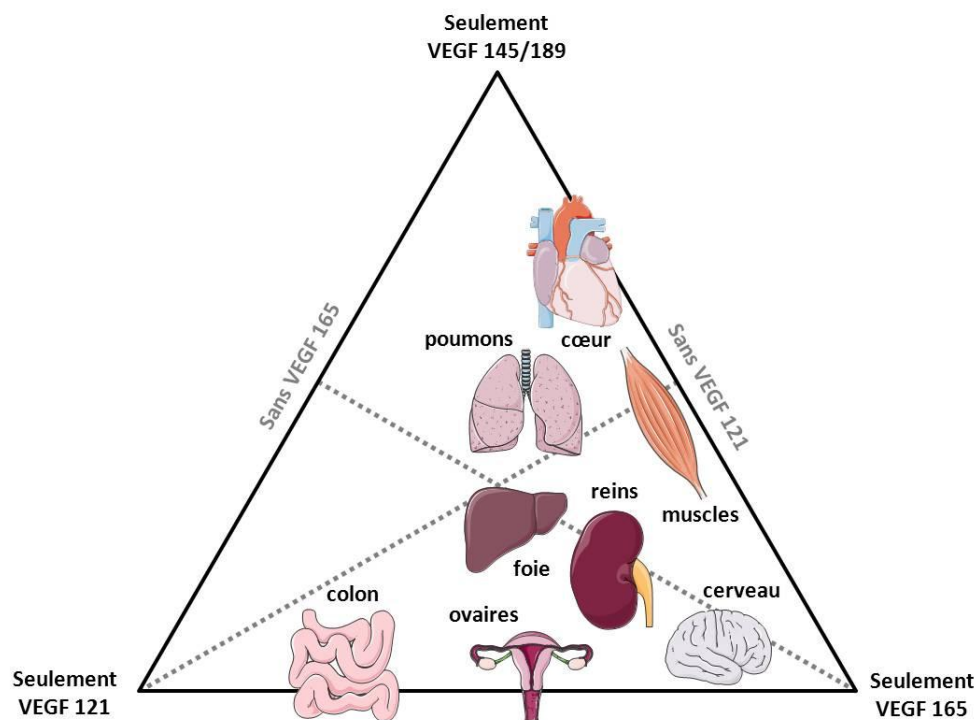


FIGURE 19 : REPARTITION DES ISOFORMES DU VEGF EN FONCTION DES ORGANES
Les organes les plus à droite ont peu de VEGF soluble (121). Ceux en haut ont plus de formes matricielles (145 et 189).
D'après les données chez l'humain de (Vempati, Popel, et Mac Gabhann 2014).

La plupart des cellules produisant du VEGF semblent exprimer majoritairement les VEGF120, 164 et 188. Au contraire, les VEGF144 et 205 sont plus rares. L'épissage alternatif de l'ARNm du VEGF est tissu spécifique mais les mécanismes qui déterminent les niveaux relatifs d'expression sont encore indéterminés (Bacic, Edwards, et Merrill 1995; Vempati, Popel, et Mac Gabhann 2014). Le VEGF 188 est fortement exprimé dans les poumons, le coeur ou le foie qui ont une vascularisation provenant de la vasculogénèse (cellules endothéliales formées pendant le développement embryonnaire). Cette isoforme permet, par exemple, de maintenir la différenciation des cellules épithéliales formant les alvéoles des poumons. Une dérégulation des ratios d'isoformes, et notamment la surexpression du VEGF 120, entraîne au contraire le développement de la néovascularisation (formation de nouveaux vaisseaux) renforçant la croissance des tumeurs (Vempati, Popel, et Mac Gabhann 2014).

Les isoformes de VEGF dans la MEC constituent un réservoir de facteurs de croissance qui peut être lentement libéré par exposition aux héparinases ou plus rapidement mobilisé par des enzymes

protéolytiques (Houck et al. 1992; Plouët et al. 1997). Ces enzymes contribuent à la dépolymérisation de la MEC et au relargage du VEGF séquestré.

L'équipe d'Iruela-Arispe s'intéresse aux différences de signalisations moléculaires entre les formes solubles et matricielles du VEGF (T. T. Chen et al. 2010). Le VEGF matriciel a un taux plus élevé d'internalisation du complexe VEGF-VEGFR2 et permet une activation plus longue du récepteur 2, donc de sa signalisation. Pour cela, le complexe VEGF-VEGFR2 s'associe avec les intégrines $\beta 1$. Cette interaction facilite le recrutement des intégrines au niveau des adhésions focales, permet leur redistribution après internalisation, et augmente leur proximité. Un processus totalement absent si les cellules sont en contact de VEGF soluble (Figure 20). Ce dernier permet par contre une plus forte association du complexe VEGF-VEGFR2 avec NRP1 (Neuropiline 1). Cependant, ces expériences étant réalisées sur des cellules endothéliales, la signalisation n'est peut être pas identique chez les CSS.

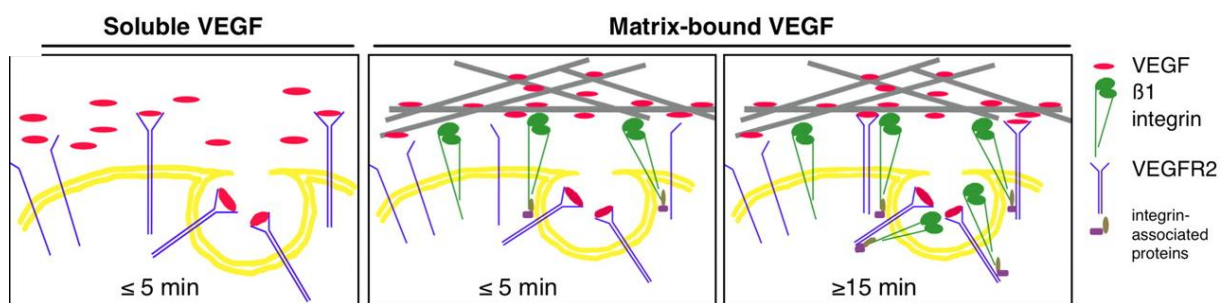


FIGURE 20 : LE COMPLEXE VEGF MATRICIEL - VEGFR2 S'ASSOCIE AUX INTEGRINES $\beta 1$ POUR AUGMENTER LE RENOUELEMENT DES ADHESIONS FOCALLES (T. T. Chen et al. 2010)

Un an plus tard, la même équipe montre que l'internalisation du VEGF avec son récepteur 2 n'est finalement pas nécessaire, sa liaison suffit à phosphoryler le récepteur et à l'activer. Le VEGF fixé à la matrice ayant une demi-vie trois fois plus élevée, ceci permet de le réutiliser plusieurs fois et de répéter ainsi les phases de phosphorylation du VEGFR2 (Anderson et al. 2011).

1. 2) LES RECEPTEURS DU VEGF-A ET LEUR SIGNALISATION

La signalisation paracrine du VEGF s'effectue en majorité par les récepteurs 1 et 2 (P. Carmeliet et al. 1996). Toutes les isoformes peuvent se fixer aux deux récepteurs, mais l'affinité du VEGF pour son récepteur 1 est dix fois plus forte que celle pour le récepteur 2. Le VEGFR2 possède par contre une activité tyrosine kinase plus importante, qui fait de lui le récepteur majeur de la signalisation du VEGF. La phosphorylation des résidus tyrosine spécifiques du domaine intracellulaire du VEGFR2 entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisations, incluant celle des MAPK (protéines-kinases activées par des agents mitogènes), des PI3K (phosphatidylinositol-kinase de type 3)/Akt (protéine kinase B), des kinases Src (Proto-oncogènes codant pour des tyrosine kinases SRC) ou encore celle de la RhoGTPases Rac1 (Koch et al. 2011). Le VEGFR1, qui possède une faible activité tyrosine kinase, permet par contre de jouer le rôle de récepteur leurre pour le VEGF, entrant en compétition avec le VEGFR2. Le VEGFR-1 servirait à capturer le VEGF en excès afin de limiter la signalisation via le VEGFR-2. Le VEGFR-1 peut aussi former des hétérodimères avec le VEGFR-2, et ceux-ci sont à l'origine de la transduction de signaux différents de ceux induits par les homodimères de VEGFR-1 ou de VEGFR-2. Par ailleurs, le gène du VEGFR1 peut coder pour un transcrit plus court, entraînant la sécrétion d'un récepteur dit soluble, dont il manque le domaine transmembranaire par épissage alternatif.

Finalement, le VEGF peut aussi se lier à un co-récepteur, la neuropiline 1 ou 2 (NRP1 ou NRP2), qui peuvent stimuler l'activation du VEGFR2 (Neufeld et al. 1999), ce qui induit une augmentation de la migration chez les cellules endothéliales. NRP1 module également la perméabilité vasculaire induite par le VEGF. En fait, les deux récepteurs NRP et VEGFR forment, en présence de leurs ligands, un complexe moléculaire qui se traduit par une réponse cellulaire accrue.

1. 3) LA SIGNALISATION INTRACRINE DU VEGF CONTROLE L'ENGAGEMENT DES CSS

L'équipe d'Olsen (Berendsen et Olsen 2013; Yanqiu Liu et al. 2012; Berendsen et Olsen 2014) a mis en évidence une nouvelle action du VEGF sur la différenciation des CSS par une signalisation autocrine différente des autres montrées auparavant. C'est cette signalisation qui contrôlerait l'équilibre entre adipogénèse et ostéogénèse.

Une perte du VEGF *in vitro* dans des CSS entraîne des altérations dans les deux voies de différenciations adipogénique et ostéogénique. Ces altérations peuvent être restaurées par l'expression de VEGF en intracellulaire, par rétrovirus, ce qui n'est pas retrouvé en ajoutant seulement du VEGF recombinant dans le milieu de culture. De plus, les CSS montrent une diminution de leur expression de VEGF avec l'âge, coïncidant avec l'apparition des caractéristiques ostéoporotiques, telles que la perte de masse osseuse et l'envahissement du tissu adipeux médullaire (P. Meunier et al. 1971). Olsen propose donc que l'équilibre de différenciation des CSS serait dépendant du VEGF qui stimule d'une part l'ostéogénèse et inhibe d'autre part l'adipogénèse (Yanqiu Liu et al. 2012).

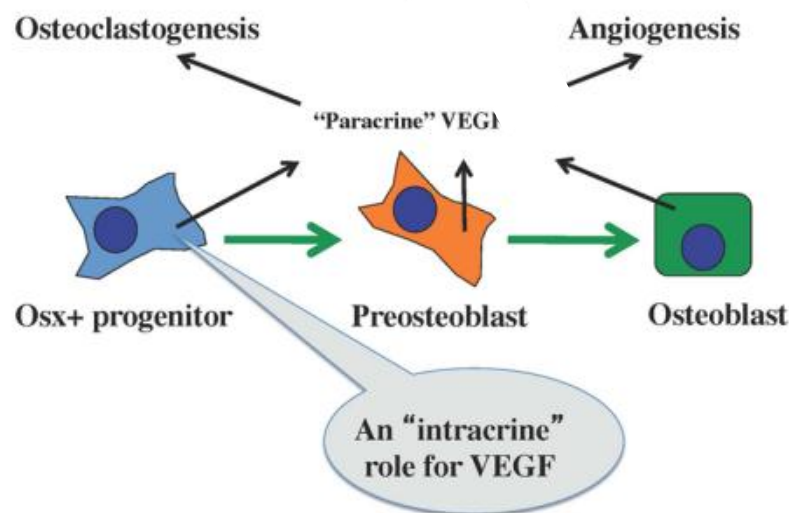


FIGURE 21 : LE VEGF PRODUIT PAR LES PRECURSEURS OSTEOBLASTIQUES STIMULE L'OSTEOGENESE DES PREOSTEOBLASTES PAR UNE SIGNALISATION INTRACRINE (Berendsen et Olsen 2013)

Les récepteurs 1 et 2 du VEGF sont nécessaires à l'ostéogénèse. De plus, une interaction croisée apparaît entre la lamine A, protéine de l'enveloppe nucléaire, et le VEGF. La lamine A joue un rôle important dans la rigidité du noyau, qui peut dépendre de la rigidité du substrat sur lequel la cellule a adhéré, régulant l'engagement des cellules multipotentes. En effet, les filaments intermédiaires qui composent la lamine, s'assemblent sous forme de dimères bispiralés autour de l'enveloppe nucléaire et sont ainsi associés au moins indirectement à la chromatine (Shimi et al. 2010), modulant l'expression des gènes et la différenciation (Akter et al. 2009; Berendsen et Olsen 2014). Ainsi,

l'adipogénèse des CSS sur un substrat mou est renforcée par des niveaux faibles en lamine, alors que l'ostéoblastogénèse sur matrice rigide est permise par des niveaux élevés en lamine (Swift et al. 2013). La rigidité des tissus et le stress mécanique peuvent augmenter de la même façon les niveaux en lamine, stabilisant le noyau tout en jouant sur l'engagement des cellules multipotentes. Or, des souris knock-out pour le VEGF montrent une induction de l'expression de la lamine A, tandis que la délétion d'un allèle pour la lamine A entraîne une diminution de l'expression du VEGF. La lamine A et le VEGF contrôlent donc tous les deux les différenciations en adipocytes et en ostéoblastes, en jouant sur les facteurs de transcription PPAR γ et Runx2 respectivement (Figure 22).

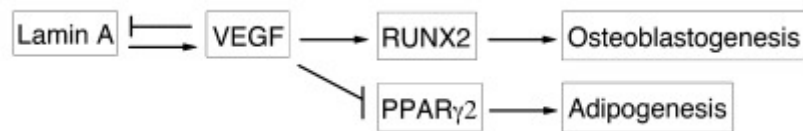


FIGURE 22 : LA LAMINE A ET LE VEGF PERMETTENT L'OSTEOBLASTOGENESE PAR INDUCTION DE RUNX2 ET INHIBITION DE PPAR γ CHEZ LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES (Yanqiu Liu et al. 2012)

Par ailleurs, Liu et coll. montrent aussi une compartimentation différentielle du VEGF et de son récepteur 2 (Yanqiu Liu et al. 2012). Le VEGF est retrouvé plutôt dans le cytoplasme des adipocytes contrairement aux ostéoblastes où il est nucléaire, de même pour le VEGFR2 qui est exclusivement nucléaire chez les ostéoblastes et apparaît à la fois cytoplasmique et nucléaire dans les adipocytes. Ces résultats ont été confirmés lors d'expériences réalisées en 2D au laboratoire. Des C3H10T1/2 ont été induites 7 jours en adipocytes ou en ostéoblastes, puis le VEGFR2 a été marqué par immunofluorescence, de même que le VEGF (Figure 23).

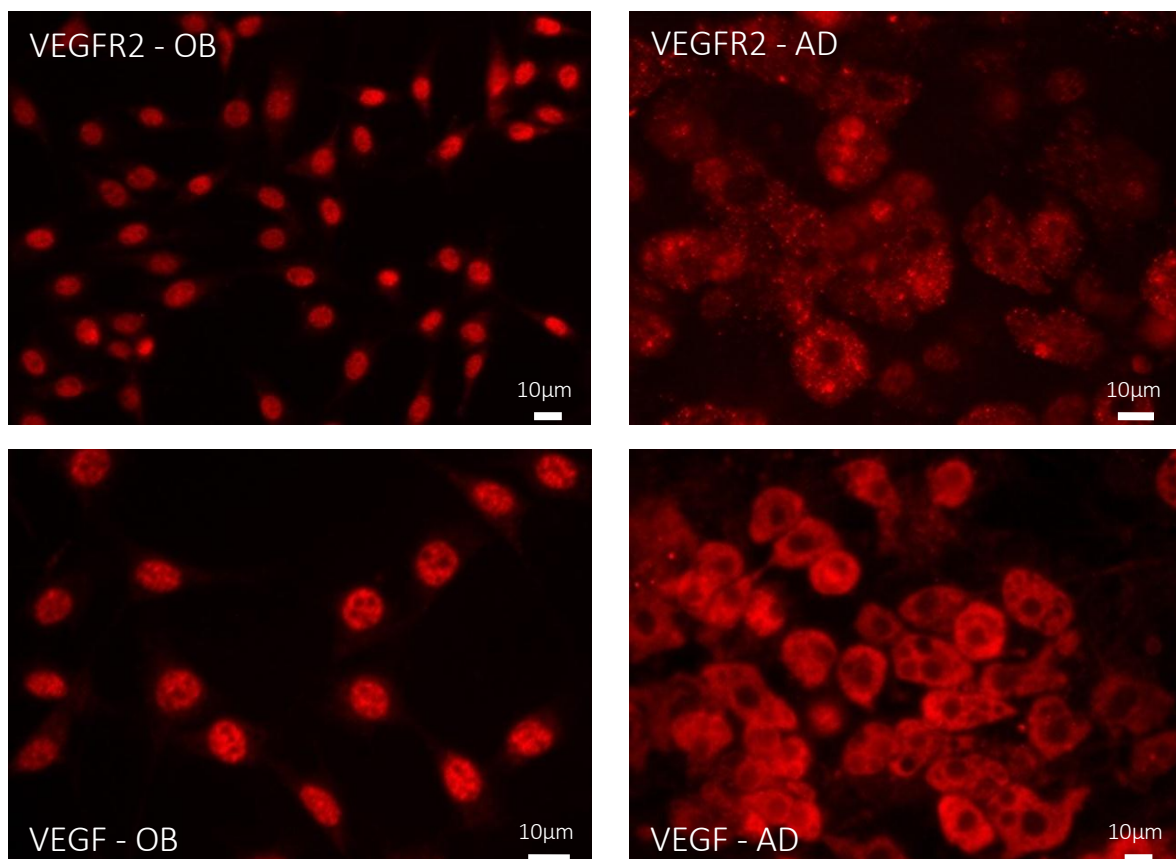


FIGURE 23 : MARQUAGES IMMUNOFLUORESCENTS DU VEGFR2 ET DU VEGF
C3H10T1/2 cultivées en 2D jusqu'à 7 jours d'induction en milieux adipocytaires (AD) ou ostéogéniques (OB). Les VEGFR2 et VEGF sont retrouvés exclusivement au noyau des ostéoblastes tandis que le VEGF est cytoplasmique chez les adipocytes et à la fois nucléaire ou cytoplasmique chez les adipocytes.

En ce qui concerne les signalisations autocrines ou paracrine du VEGF chez les ostéoblastes, Mayr-Wohlfart et coll. montrent qu'il est d'abord exprimé à de très faibles niveaux et que son expression s'accroît jusqu'à la différenciation terminale des ostéoblastes (Mayr-Wohlfart et al. 2002). De plus, sa signalisation passerait plutôt par le VEGFR1, puisque des souris Flt-1 $-/-$ montrent des diminutions dans leur potentiel ostéogénique et dans la densité de leurs os trabéculaires (Otomo et al. 2007). Cependant, l'équipe de Deckers met en évidence aussi une signalisation par le VEGFR2, en bloquant celle du VEGFR1 par ajout de Flt-1 soluble, permettant d'observer la formation de nodules ostéoblastiques en culture.

Chez les adipocytes, l'équipe de Bagchi a montré l'importance du récepteur 2, qui lorsqu'il est absent, entraîne leur apoptose (Bagchi et al. 2013). De plus, nous avons déjà vu que le VEGFR2 pouvait aussi se lier aux intégrines $\beta 1$. Dans ce sens, Chen et coll. montrent justement que l'expression des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ diminue pendant l'adipogénèse, car si elle est trop élevée, elle réprime leur différenciation terminale (T. T. Chen et al. 2010). La répression des intégrines αv ou $\beta 1$ induit l'adipogénèse et inhibe l'ostéogénèse (Q. Chen et al. 2014).

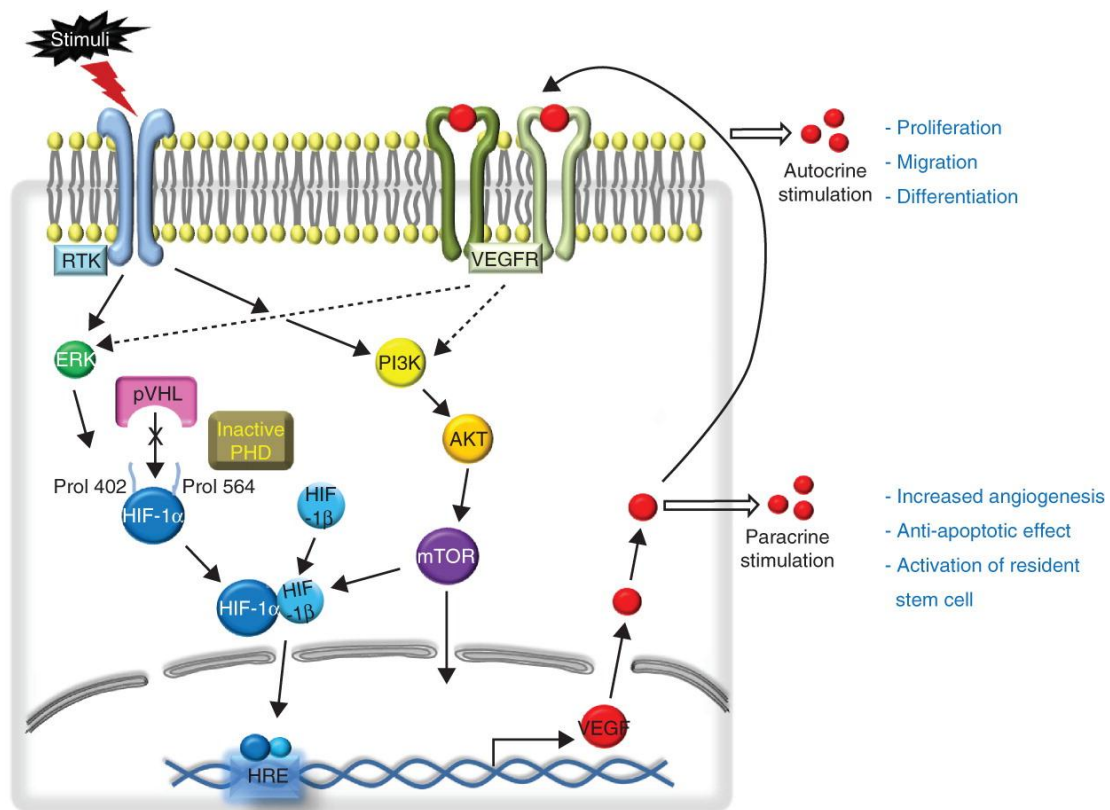


FIGURE 24 : LES VOIES AUTOCRINES ET PARACRINES DU VEGF SUR LES PRECURSEURS ADIPEUX

ERK: Extracellular-signal-regulated kinase; HIF: Hypoxia-inducible factor; HRE: Hypoxia responsive element; mTOR: Mammalian target of rapamycin; PHD: Prolyl hydroxylase; pVHL: Von Hippel Lindau tumor suppressor protein; RTK: Receptor tyrosine kinase; VEGFR: VEGF receptor. (S.-Y. Song, Chung, et Sung 2010)

Les mécanismes précis de cette signalisation du VEGF ne sont pas encore totalement clairs, notamment concernant l'implication de sa liaison et/ou activation aux récepteurs 1 et 2, la question reste à savoir comment les cellules modulent cet équilibre entre signalisations intracrine et autocrine/paracrine.

Dans tous les cas, ce VEGF sécrété par les adipocytes et les ostéoblastes est important pour l'angiogénèse de leur environnement direct, permettant d'apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires aux processus de stockage de lipides, pour les adipocytes, ou de sécrétion de collagène dans la matrice osseuse, pour les ostéoblastes, demandant beaucoup d'énergie. Pour l'adipogénèse précisément, Song et coll. expliquent aussi que le VEGF sécrété par les adipocytes permettrait une stimulation autocrine de la prolifération (par la voie PI3K/Akt/mTOR (Cible de la rapamycine chez les mammifères)) et de la différenciation des adipocytes entre eux, et une stimulation paracrine de l'angiogénèse pour permettre leur maturation (Figure 24)(S.-Y. Song, Chung, et Sung 2010). Cette signalisation autocrine passerait plutôt par Flk-1 (Tam et al. 2009).

1. 4) LES ISOFORMES DU VEGF ET LA DIFFERENCIATION DES CSS

Peu de données sont disponibles sur la régulation spécifique des isoformes du VEGF pendant la différenciation des CSS en adipocytes ou en ostéoblastes.

4) A) LES ISOFORMES DU VEGF DANS L'ADIPOGENESE

L'équipe de Hovey a regardé la signalisation des isoformes du VEGF pendant l'adipogénèse (Hovey et al. 2001). Elle montre que sur des 3T3-L1, l'expression du VEGF 188 a lieu lors de la différenciation terminale des adipocytes, alors que les VEGF 120 et 164 sont exprimés lors de l'engagement des cellules multipotentes. Les 3T3-L1 sont plutôt considérés comme des adipocytes blancs. Ils exprimeraient plus de VEGF 188 que de 120, si on les assimile à du tissu blanc de rat (Asano et al. 1997). Mais lorsque ces adipocytes de rats sont cultivés à basse température, la "brunification" qui s'opère entraînerait plutôt l'induction du VEGF 120 au détriment du 188. Les adipocytes médullaires sont caractérisés par un phénotype intermédiaire entre les blancs et les bruns et devraient donc être assez équilibrés entre les formes matricielles et solubles.

4) B) LES ISOFORMES DU VEGF DANS L'OSTEOGENESE : PHENOTYPES OSSEUX

L'équipe de Maes a réalisé plusieurs études du phénotype osseux de souris n'exprimant qu'une seule isoforme du VEGF. Ils ont montré que l'expression seule du VEGF164 et/ou du 188 est suffisante à une différenciation normale des ostéoblastes et pour le développement métaphysaire (Maes et al. 2002).

Les souris n'exprimant que du VEGF 188 ont cependant un phénotype de nanisme, un surdéveloppement des plaques de croissance et des centres d'ossification secondaires perturbés. Ce phénotype est en partie dû à une altération de la vascularisation entourant l'épiphyse, entraînant une augmentation de l'hypoxie et une apoptose massive des chondrocytes à l'intérieur du cartilage épiphysaire. En plus de ces anomalies vasculaires, les chondrocytes n'exprimant que le 188 *in vitro* sont incapables de proliférer et de survivre à l'hypoxie. Ces résultats indiquent que le VEGF matriciel n'est pas suffisant pour établir la vascularisation épiphysaire et la régulation du développement du cartilage pendant la formation osseuse endochondrale (Maes et al. 2004).

Les souris n'exprimant que du VEGF 120 ont une forte diminution de la minéralisation du squelette, ainsi que les centres d'ossification endochondrales primaires de la métaphyse des os longs (Zelzer et al., 2002; Maes et al., 2004). Par contre, le réseau vasculaire, la croissance du squelette et la minéralisation des souris exprimant seulement le VEGF164 apparaissent normaux comparés à des souris sauvages (Maes et al., 2004).

L'expression du VEGF164 et/ou 188 est important pour un développement de l'os endochondral normal, car ils permet non seulement de servir de médiateur de la vascularisation de l'os, mais aussi d'induire une différenciation normale des chondrocytes hypertrophiques, des ostéoblastes, des ostéoclastes et des cellules endothéliales (Maes et al. 2002).

Le VEGF peut aussi passer par les IGFs (insulin-like growth factor) pour induire l'ostéogénèse. Ce sont des petits polypeptides qui stimulent la réplication des cellules de la lignée ostéoblastique de manière dépendante de la production de monoxyde d'azote (Lagumdzija et al. 2004) et augmentent la synthèse du collagène et d'autres protéines matricielles. Lorsque le gène codant pour le récepteur à l'IGF-1 est déficient, le volume d'os spongieux diminue significativement et le dépôt de minéralisation dans la matrice ostéoïde est limitée (M. Zhang et al. 2002). Le lien entre le VEGF164 et l'IGF a été établi par les travaux de Wang et coll. (D. S. Wang et al. 1997). Cette étude a montré qu'en présence de cellules endothéliales, les ostéoblastes libèrent du VEGF164 qui va alors activer les récepteurs 1 et 2 du VEGF chez les cellules endothéliales. En réponse au VEGF164 produit, les cellules endothéliales sécrètent de l'IGF-1 et de l'ET-1 (Endothéline 1) qui stimulent la fonction des ostéoblastes, l'augmentation de la phosphatase alcaline (PAL) et de l'ostéocalcine (D. S. Wang et al. 1997).

1. 5) SYNTHÈSE

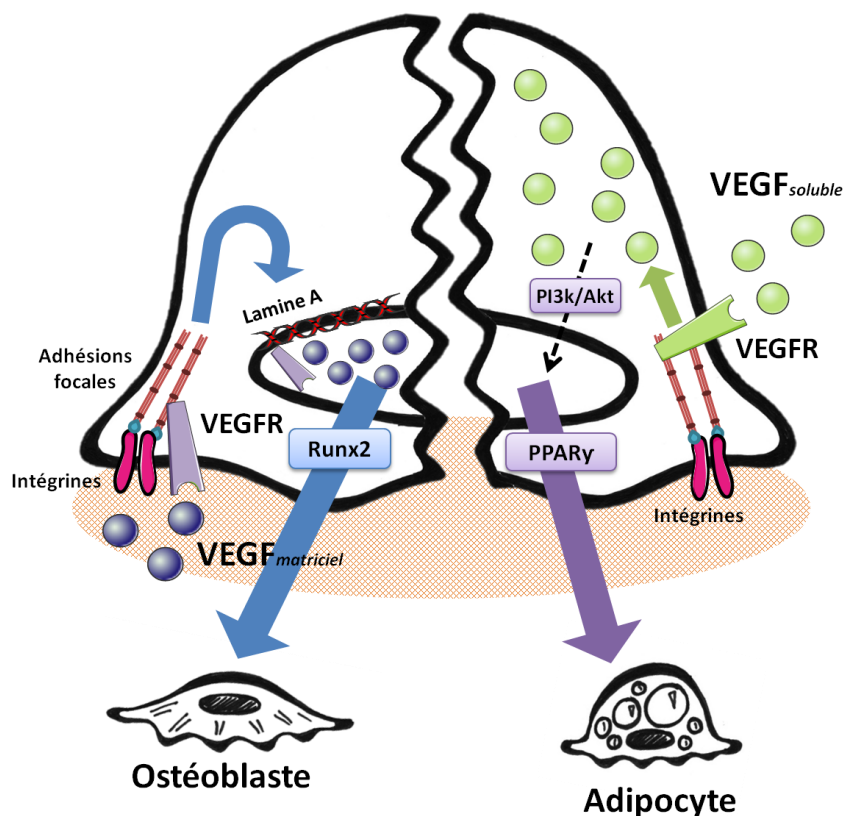


FIGURE 25 : LES VOIES DE SIGNALISATION DU VEGF CHEZ LES CSS

La voie de signalisation du VEGF apparaît clairement comme pouvant être déterminante dans l'équilibre entre adipogénèse et ostéogénèse. En effet, beaucoup de types cellulaires différents expriment le VEGF, et son rôle peut aller de la survie cellulaire au contrôle de l'engagement des cellules multipotentes. Ce VEGF sécrété est d'une part important pour l'élaboration des vaisseaux sanguins apportant les nutriments et l'oxygène nécessaires au métabolisme des adipocytes et des ostéoblastes. Le VEGF matriciel peut, lui, constituer un réservoir de facteurs de croissance qui peut être utilisé par les cellules adhérentes, sachant que le complexe VEGF-VEGFR2 s'associe avec les intégrines pour faciliter leur recrutement au niveau des adhésions focales.

Mais une nouvelle voie de régulation a été mise en évidence par l'équipe d'Olsen. Le VEGF peut agir par une signalisation autocrine qui contrôle l'équilibre entre l'adipogénèse et l'ostéogénèse. Une interaction croisée entre la lamine A et le VEGF contrôle les différenciations en adipocytes et en ostéoblastes, en jouant sur les facteurs de transcription PPAR γ et Runx2. Pour cela, le VEGF et son récepteur 2 se retrouvent plutôt dans le cytoplasme des adipocytes contrairement aux ostéoblastes où il est nucléaire (Figure 25).

En ce qui concerne les isoformes du VEGF, elles sont exprimées différemment en fonction du type cellulaire. Les adipocytes blancs en maturation montrent plutôt du VEGF188, tandis que les bruns du VEGF120. Chez les ostéoblastes, les trois formes sont importantes, mais l'expression seule du VEGF164 et/ou du 188 est suffisante à une différenciation normale.

Parmi les acteurs impliqués dans cette signalisation du VEGF, les protéines Rho de la famille des GTPases peuvent avoir un rôle clé. La partie suivante fait le point sur leur signalisation, modulant l'engagement des CSS en réponse à la mécanotransduction.

B. 2. RHOGTPASES ET MECANOTRANSDUCTION

Les contraintes mécaniques sont essentielles pour les cellules et les organismes. Elles modulent de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la prolifération, la différenciation, la migration, l'expression génique, la synthèse des protéines, ou l'apoptose. Les forces mécaniques influent directement sur la forme et la fonction des tissus, par exemple : les effets de la compression sur l'os et le cartilage ou les tensions sur les muscles et la peau (Van Essen 1997; Alenghat et Ingber 2002). Diverses stimulations mécaniques engendreront différentes réponses cellulaires (McGarry et al. 2005; Smalt et al. 1997), mais aussi les cellules, selon leur stade de maturité, vont soit réagir de la même manière à un même stimulus (Pitsillides et al. 1995), soit de façons complètement différentes (Burger et Klein-Nulend 1998).

En termes de contraintes mécaniques, les cellules ne sont donc pas sensibles de la même façon. En impesanteur, par exemple, le désassemblage des contacts focaux et du cytosquelette est plutôt observé chez des cellules en phase post-mitotique (A. Guignandon et al. 2001), suggérant que la perte de gravité impacterait de façon plus forte les structures impliquées dans des processus dynamiques tels que les divisions cellulaires. La capacité des CSS à rester souche est liée aux divisions cellulaires et est donc grandement dépendante des signaux externes qui peuvent être appliqués aux cellules.

En général, les cellules souches ont tendance à être plutôt "souples", ceci étant lié à l'architecture encore immature de leur cytosquelette. Leur plasticité cellulaire est particulièrement sensible aux changements physiques dans les forces externes appliquées par leur environnement direct. Des cellules souches endothéliales sont, par exemple, dix fois plus souples que des progéniteurs déjà engagés et possèdent une sensibilité très forte aux contraintes locales qui vont déclencher leur étalement cellulaire et leur différenciation (Chowdhury et al. 2010). De même, des CSS très indifférenciées possèdent un module d'élasticité inférieur à celui des fibroblastes différenciés (Titushkin et Cho 2007). Quels sont les acteurs et les conséquences de la mécanotransduction sur l'engagement des CSS ?

2. 1) LES PROTEINES RHO DE LA FAMILLE DES RHOGTPASES

1) A) INTERRUPTEURS MOLECULAIRES

Les RhoGTPases sont des petites protéines, exprimées dans toutes les cellules eucaryotes, dont le rôle est l'organisation et la régulation de la dynamique du cytosquelette. Elles modulent aussi la formation des adhésions entre cellules et matrice extra-cellulaire, et contrôlent l'expression des gènes, la survie ou la prolifération cellulaire (Etienne-Manneville et Hall 2002). Elles font partie d'une superfamille de petites protéines qui se lient au GTP, appelée Ras, et divisée en plusieurs grandes catégories. Dans celle des RhoGTPases se trouve principalement : RhoA, Rac1 et Cdc42 (Protéine 42 de contrôle de la division cellulaire). Ces GTPases sont des interrupteurs moléculaires qui utilisent un processus biochimique simple pour contrôler différentes voies cellulaires complexes. Ces protéines possèdent deux états conformationnels: un état lié à la guanosine triphosphate (GTP) et dit forme « active », et un autre lié à la guanosine diphosphate (GDP) et dit forme « inactive ». A l'état inactif, les RhoGTPases sont séquestrées dans le cytoplasme, et lorsqu'un signal transite à travers les intégrines ou différents récepteurs de facteurs de croissance, elles passent à leur forme active et transloquent jusqu'à la membrane cellulaire (A J Ridley et Hall 1992). Là, elles vont activer des molécules effectrices distinctes et spécifiques qui à leur tour régulent l'organisation du cytosquelette et l'adhésion cellule-matrice,

contrôlant ainsi les activités cellulaires telles que l'étalement, la prolifération cellulaire ou l'expression de gènes spécifiques (Jaffe et Hall 2005).

Le cycle entre les formes actives et inactives est sous le contrôle direct de trois groupes de protéines de régulation (Figure 26). Les *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) catalysent l'échange du GDP en GTP pour activer les protéines Rho. Les protéines Rho sont ensuite désactivées par les *GTPase-activating proteins* (GAPs), qui augmentent l'activité intrinsèque de la GTPase, conduisant à l'hydrolyse du GTP en GDP. Le troisième groupe de protéines impliquées dans le cycle de la signalisation de Rho sont les *guanine dissociation inhibitors* (RhoGDI), qui cachent les groupes isoprényles des GTPases, entraînant leur séquestration sous forme inactive dans le cytosol. Les RhoGDIs inhibent également la libération du GDP de la GTPase et contribuent au maintien dans son état inactif (Huveneers et Danen 2009).

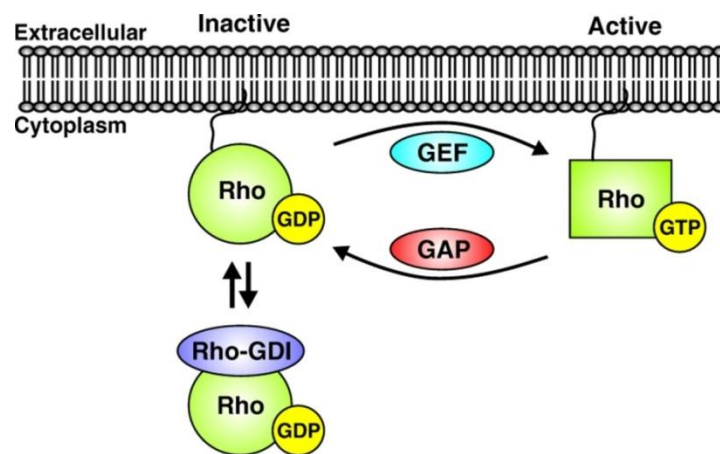


FIGURE 26 : LE CYCLE DES PROTEINES RHO DE LA FAMILLE DES GTPASES (Huveneers et Danen 2009).

Le cycle des protéines Rho est stimulée par des agonistes agissant par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), par les récepteurs de la tyrosine kinase, par l'activation des récepteurs de cytokines, ou par les contraintes mécaniques qui régulent principalement l'activité des GEFs (Chiariello et al. 2010).

Une nouvelle voie de régulation de l'activité des RhoGTPases a été mise en évidence l'année dernière par l'équipe de Belaid (Belaid et al. 2013). Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une forte activité de RhoA qui permet d'assurer leur prolifération accrue. Or, un défaut d'autophagie a aussi été observé. L'autophagie concerne le recyclage, par la cellule, d'une partie de son cytoplasme, en cas de besoins (différenciations) ou en cas de stress, en les dégradant par ses propres lysosomes. Cette autophagie permettrait de limiter l'activité des protéines à longue durée de vie, telles que les RhoGTPases sous forme active (RhoA-GTP), pour maintenir un niveau approprié aux différents processus de la cellule.

Les actions les plus connues des RhoGTPases sur les paramètres mécaniques du cytosquelette ont été mises en évidence dans des modèles de lignées cellulaires exprimant de façon constitutive RhoA ou Rac1. Ces modèles montrent que l'activation de RhoA conduit à un meilleur étalement cellulaire, mais sont moins mécanosensibles, tandis que l'activation de Rac1 stimule la mécanotransduction (Servotte et al. 2006). Ces résultats révèlent l'importance des RhoGTPases sur la sensibilité mécanique des cellules, l'adaptation de leur forme ou la transduction du signal. Leur rôle clé dans l'adaptation des cellules à l'impesanteur semble évident. Les détails des différentes régulations effectuées par les

GTPases sur les mécanismes cellulaires et le métabolisme en impesanteur, est donné dans la revue (Voir Revue p.93).

1) B) GTPASES ET CYTOQUELETTE

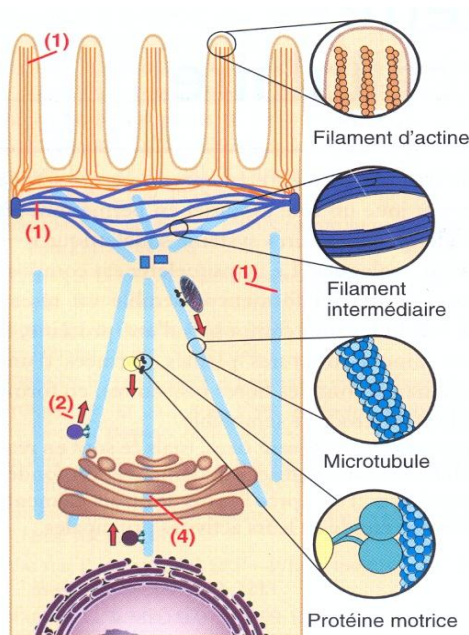


FIGURE 27 : STRUCTURE ET FONCTIONS DU CYTOQUELETTE.

Les microtubules servent de soutien, de moyen de transport pour les organites ou vésicules, et pour la division cellulaire. Les filaments intermédiaires apportent un soutien structural. Les microfilaments d'actine permettent la formation des filopodes ou lamellipodes et l'elongation de la cellule pour sa migration ou division.

- (1) Structure et support
- (2) Transports intracellulaires
- (3) Contractilité et mobilité

Le cytosquelette est un réseau formé de trois systèmes interconnectés : les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Ils conditionnent la forme des cellules et leurs fonctions mécaniques (Figure 27). Outre leur implication dans les fibres contractiles d'actomyosine (ou fibres de stress), les microfilaments d'actine sont également impliqués dans la formation des protrusions membranaires, tels les lamellipodes et filopodes, et de vésicules d'endo- et d'exo-cytoses. Les microtubules constituent une part essentielle de la charpente mécanique de la cellule mais sont aussi impliqués dans la formation du fuseau mitotique et dans le transport des organites cellulaires dans la cellule (Watanabe, Noritake, et Kaibuchi 2005). Les filaments intermédiaires stabilisent la forme de la cellule et coordonnent la migration (Herrmann et al. 2007). La formation dynamique de ces fibres d'actomyosine (actine et myosine), des réseaux d'actine fibrillaire ou des microtubules est très largement régulée par les GTPases (Anne J Ridley 2006), et permet aux cellules de moduler leur forme et leur ancrage à la matrice extracellulaire (MEC).

L'activation de RhoA ou Rac1 conduit à l'assemblage des filaments contractiles d'actomyosine, la formation des lamellipodes d'actine, et celle des filopodes d'actine, qui à leur tour permettent la mise en place (par polymérisation de l'actine) et l'organisation (par regroupement des filaments) des filaments d'actine. Ainsi, la Rho kinase (ROCK) module l'activité de la myosine II non-musculaire (NMM-II) par phosphorylation (Matsumura 2005). Une autre protéine, la cofiline, module la polymérisation de l'actine et l'allongement des filaments. Sa phosphorylation entraîne son inactivation et est réalisée principalement par les kinases LIM (LIMK), qui sont activées par d'autres kinases dépendantes de Rac1. En outre, la phosphorylation de la cofiline, dépendante de LIMK, peut aussi être induite par RhoA/ROCK, et permet la stabilisation des filaments d'actomyosine (Ohashi et al. 2000)(Figure 28).

De plus, le complexe Arp2/3 (Protéines associées à l'actine 2/3) est activé par Rac1 et Cdc42 par l'intermédiaire des protéines de la famille WASP (Protéines du syndrome de Wiskott–Aldrich)/Wave (Protéine homologue de la verproline du syndrome de Wiskott–Aldrich). Il initie la polymérisation de l'actine pour former un réseau ramifié de filaments d'actine et des complexes riches en vinculine et

paxiline, notamment dans les lamellipodes au front de migration des cellules. L'activation de Cdc42 induit les formines mDia 1, 2 et 3 qui forment les complexes multiprotéiques des filopodes associant actine, vinculine, paxiline et la kinase FAK (Kinase des adhésions focales).

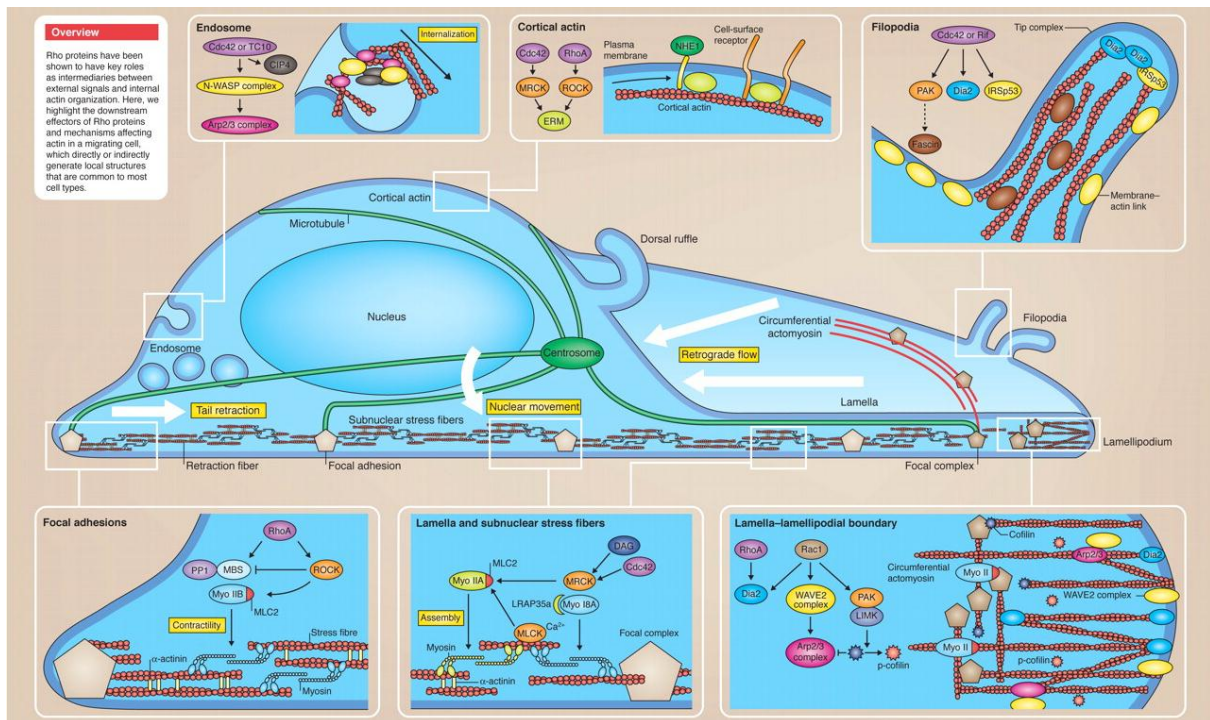


FIGURE 28 : LES RHOGTPASES ET LEUR RÔLE DANS L'ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE

Arp2/3 : actine-related protein 2/3, CIP4 : Cdc42-interacting protein 4, DAG : diacylglycerol, Dia2 : diaphanous 2, ERM : ezrin-radixin-moesin, IRSp53 : insulin-receptor substrate of 53 kDa, LIMK : LIM-domain-containing kinase, LRAP35a : leucine-rich adaptor protein 35a, MBS : myosin-binding subunit, MLC2 : myosin regulatory light chain 2, MLCK : myosin light chain kinase, MRCK : myotonic-dystrophy-kinase-related Cdc42-binding kinase, Myo : myosin, NHE1 : Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1, p-cofilin : phosphorylated cofilin, PAK : p21-activated kinase, PP : protein phosphatase 1, Rif : Rho in filopodia, ROCK : RhoAssociated protein kinase, WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein, WAVE : WASP-family verprolin-homologous (Sit et Manser 2011).

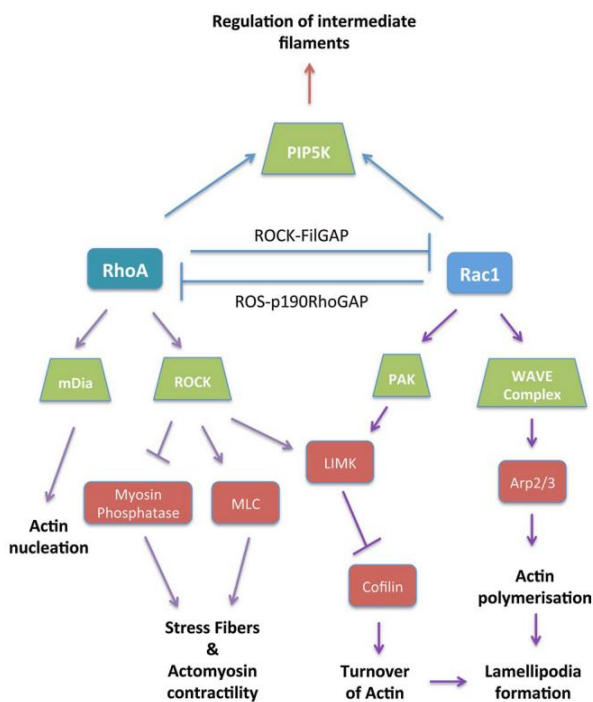


FIGURE 29 : RHOA, RAC1 ET LEURS EFFECTEURS
(Murali et Rajalingam 2014).

Par ailleurs, ROCK active l'assemblage des filaments d'actomyosine en phosphorylant directement la myosine light chain (MLC) mais également en inhibant la myosine phosphatase. Ces deux mécanismes conduisent à une phosphorylation accrue de la MLC, ce qui aboutit à la formation des fibres de stress et à une contractilité accrue de la cellule (Figure 29). En plus de leur effet sur la dynamique du cytosquelette, les kinases effectrices de Rho participent également à la régulation de la transcription de nombreux gènes au travers des cascades de signalisation des MAPK. Leur implication dans la survie, la mort et la progression du cycle cellulaire est également bien établie (Etienne-Manneville et Hall 2002).

1) C) GTPASES ET MIGRATION CELLULAIRE

Les cellules en migration, comme montrées dans la figure (Figure 30), possèdent une morphologie caractéristique avec une polarisation et une distribution asymétrique du cytosquelette d'actine et de microtubule. Ce sont les lamellipodes qui initient le front de migration, stabilisés par de nouvelles adhésions focales, tandis que les adhésions à l'arrière de la cellule se dissolvent au fur et à mesure de la migration, permettant une rétraction du corps cellulaire par contraction des fibres d'actomyosine. Le rôle des GTPases dans la migration a été largement documenté :

- **Cdc42** permet la polarisation, formant les filopodes à l'avant de la cellule et déterminant la direction de migration. Il participe également au positionnement du centre organisateur des microtubules (MTOC), facilitant la formation de microtubules vers l'avant afin d'apporter les vésicules de protéines nécessaires au déplacement (Etienne-Manneville et Hall 2002);
- **Rac1** joue le rôle de moteur en induisant la polymérisation du réseau de filaments d'actine à l'avant des cellules, permettant la création de nouvelles adhésions entraînant la force protrusive (Gardiner et al. 2002);
- **RhoA** participe à la maturation des adhésions focales de l'avant de la cellule tout en dissolvant les adhésions à l'opposé du front de migration et en permettant la contraction de l'arrière du corps cellulaire (Raftopoulou et Hall 2004).

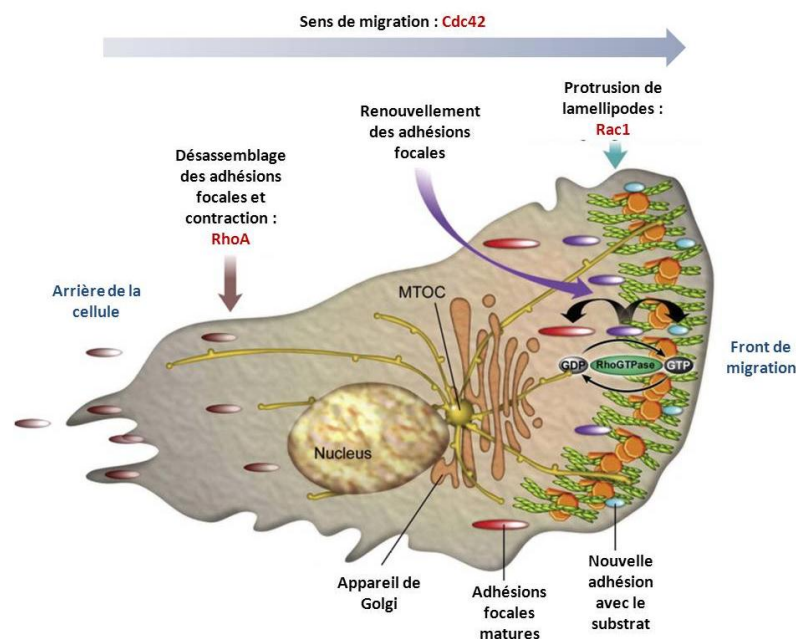


FIGURE 30 : LES RHO GTPASES DANS LA MIGRATION CELLULAIRE
D'après (Tomar et Schlaepfer 2009)

1) D) GTPASES ET MATRICE EXTRACELLULAIRE

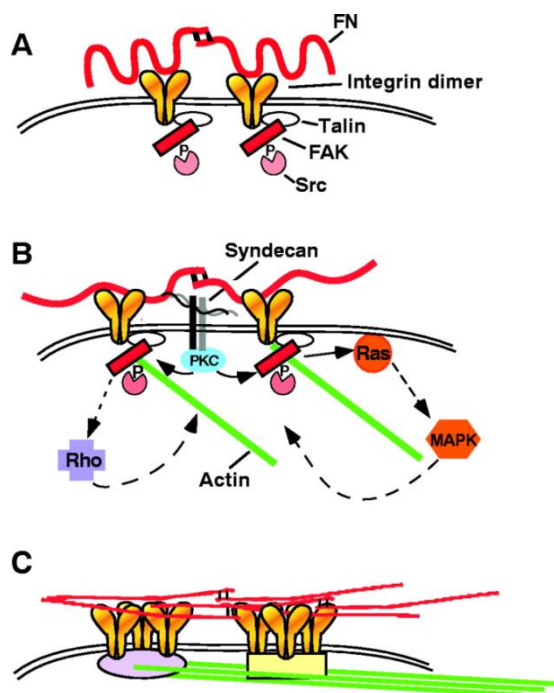


FIGURE 31 : RHOA ACTIVE LA FIBRILLOGÈNESE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE. FN : fibronectine (Wierzbicka-Patynowski et Schwarzbauer 2003)

De plus, les RhoGTPases interviennent dans la formation de la matrice extracellulaire. Celle-ci est constituée de protéines fibrillaires (collagène et élastine) auxquelles s'associent des glycoprotéines et protéines matricielles (fibronectine, laminine...), ainsi que des protéoglycanes. L'assemblage de la matrice de fibronectine requiert des intégrines, notamment les $\alpha 5 \beta 1$, dont la liaison au cytosquelette d'actine intracellulaire est cruciale pour la fibrillogénèse. Les inhibiteurs de fibres de stress ou de RhoA empêchent l'assemblage des fibrilles de fibronectine et montrent l'importance des GTPases dans ce processus (Sechler et al. 2001). RhoA permet de générer la tension et la contractilité (Féral et al. 2007), puis les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et les fibres de stress modulent les adhésions focales. Ces mouvements permettent la polymérisation des fibrilles de fibronectine (Figure 31) (Wierzbicka-Patynowski et Schwarzbauer 2003). RhoA stimule aussi la fibrillogénèse induite par les intégrines $\alpha \nu \beta 5$ (Danen et al. 2002). Il permet d'activer aussi la synthèse des fibres de collagène I de la matrice extracellulaire (Kondrikov et al. 2011).

1) E) SYNTHÈSE

L'identification de structures capables de détecter les pressions et les déformations provoquées par une tension gravitationnelle ou mécanique, nous a amené à considérer les protéines Rho de la famille des GTPases. Ces protéines, en amont des régulateurs du cytosquelette, peuvent agir comme « senseurs » de la gravité. Ce sont des protéines qui agissent comme des interrupteurs, avec une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP, et qui sont situées au carrefour de nombreuses voies de signalisation.

Au niveau cellulaire, l'impesanteur peut se caractériser comme réprimant la prolifération ou la différenciation des cellules, et modulant leur morphologie. En ce qui concerne la régulation des RhoGTPases en cas d'absence de gravité, peu de données existent. L'équipe de Zayzafoon montre une forte diminution de la forme active de RhoA (-88% (± 2 %)) résultant en une inhibition de la phosphorylation de la cofiline après 7 jours en impesanteur, et une absence de fibres de stress (Meyers et al. 2005; Zayzafoon, Gathings, et McDonald 2004), résultats retrouvés en impesanteur simulée (Wan et al. 2013) (+ Voir Revue p.93).

Compte-tenu du contrôle effectué par les RhoGTPases sur le cytosquelette, cette diminution de l'activité de RhoA explique à elle seule les changements morphologiques observés en impesanteur (cellules rondes, moins adhérentes...) (Figure 32), tous les détails étant fournis dans la revue, (Voir Revue p.93).

La question se pose à présent sur les conséquences observées sur la différenciation des cellules souches de l'os par rapport aux GTPases.

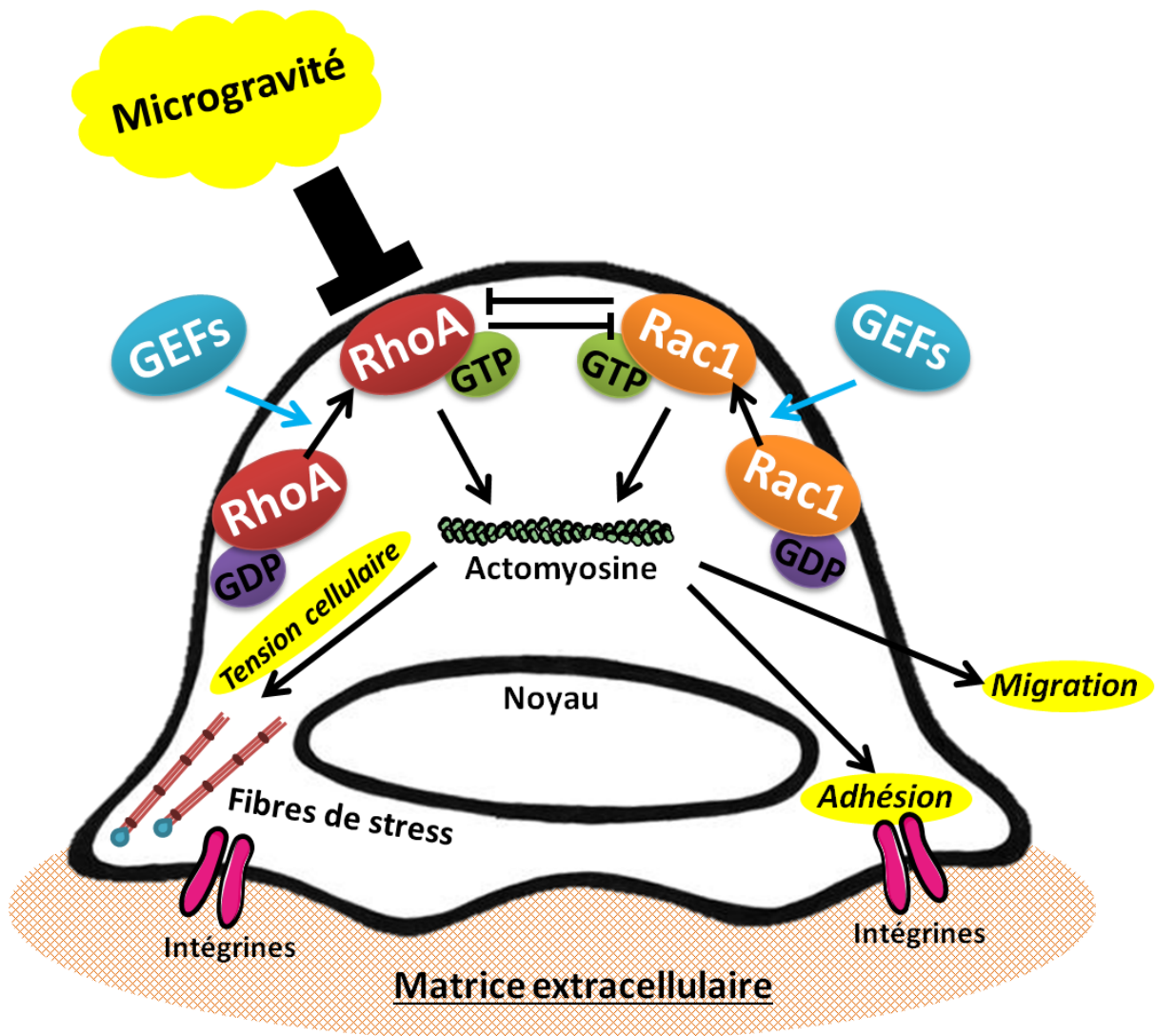


FIGURE 32 : SCHEMA DE SYNTHÈSE DE L'ACTION DES RHO GTPASES DANS LA MODULATION DU CYTOSQUELETTE

2. 2) L'IMPORTANCE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DANS L'ENGAGEMENT DES CSS

Plusieurs études ont montré que la composition et la rigidité de la matrice extracellulaire (MEC) pouvait moduler la tension intracellulaire et ainsi la différenciation des cellules multipotentes (Engler et al. 2006; Shin et al. 2013). Or, qui dit tension cellulaire dit modulation du cytosquelette et donc RhoGTPases.

En ce qui concerne la composition de la MEC, la différenciation des CSS en adipocytes est inhibée si la matrice extracellulaire est modifiée par ajout de fibronectine, dont la liaison aux intégrines $\alpha 5$ empêche la maturation des adipocytes en maintenant un fort taux de formes actives de Rac1 (J. Liu et al. 2005). En fait, au cours de l'adipogénèse, la MEC subit un remodelage, en passant d'une structure riche en fibronectine vers une matrice de type lame basale riche en laminine et pauvre en fibronectine (Nakajima et al. 1998).

La rigidité de la MEC a également été montrée comme ayant un rôle dans l'engagement des CSS (Engler et al. 2006; Rowlands, George, et Cooper-White 2008). Une matrice rigide provoque une tension intracellulaire constante, induisant la formation des fibres d'actomyosine et modulant l'engagement des CSS. Une forte tension est synonyme d'ostéogénèse et une faible tension d'adipogénèse (Settleman 2004). Or, la tension intracellulaire est modulée par RhoA qui peut contracter les filaments d'actomyosine pour augmenter la tension. Ainsi, lorsqu'elles sont cultivées sur des gels de polyacrylamide dits « mous », les CSS deviennent des adipocytes, contrairement à celles ensemencées sur des matrices plus rigides qui se différencient en ostéoblastes (Winer et al. 2009).

Les cellules peuvent réguler la rigidité et la composition de leur environnement en digérant la matrice grâce à la famille des métalloprotéinases matricielles (MMP). Ce sont des peptidases sécrétées ou liées à la membrane peptidases qui clivent les composants de l'ECM (Visse et Nagase 2003). Une inhibition complète de ces MMP bloque la différenciation des pré-adipocytes engagés et le développement du tissu adipeux *in vivo* (Croissandeau, Chrétien, et Mbikay 2002; Lijnen et al. 2002).

Reste à déterminer quelles molécules ou « senseurs » détectent la rigidité de la matrice, en amont des RhoGTPases, et la façon dont ils modulent les voies de signalisation régulant l'engagement des CSS.

2. 3) UNE FORME CELLULAIRE QUI CONTROLE L'ENGAGEMENT DES CSS

La conversion des cellules souches mésenchymateuses très étalées, en adipocytes sphériques, est en partie effectuée après remodelage des structures modulant la forme des cellules (le cytosquelette) (O'Connor et Gomez 2013).

Or, depuis les travaux de McBeath et coll., nous savons que la forme d'une cellule affecte son potentiel de différenciation (McBeath et al. 2004). Les CSS ensemencées sur une grande surface sont capables de se différencier vers la lignée ostéogénique tandis que celles adhérant à une surface plus petite sont limitées à la lignée adipocytaire. Yao et coll. (Yao, Peng, et Ding 2013) ont montré que la forme de la cellule est un signal intrinsèque régulant la différenciation des cellules souches, avec ou sans facteurs d'induction exogènes. Ces conséquences sur l'engagement des cellules souches mésenchymateuses sont modulées par les RhoGTPase et la tension du cytosquelette (Settleman 2004). Ainsi, selon McBeath et coll. (McBeath et al. 2004), une CSS ayant une activité RhoA inhibée devient un adipocyte, tandis que si son activité RhoA est constitutivement induite, elle devient ostéoblastique ou myocytaire (Figure 33) (Gao, McBeath, et Chen 2010; Sordella et al. 2003).

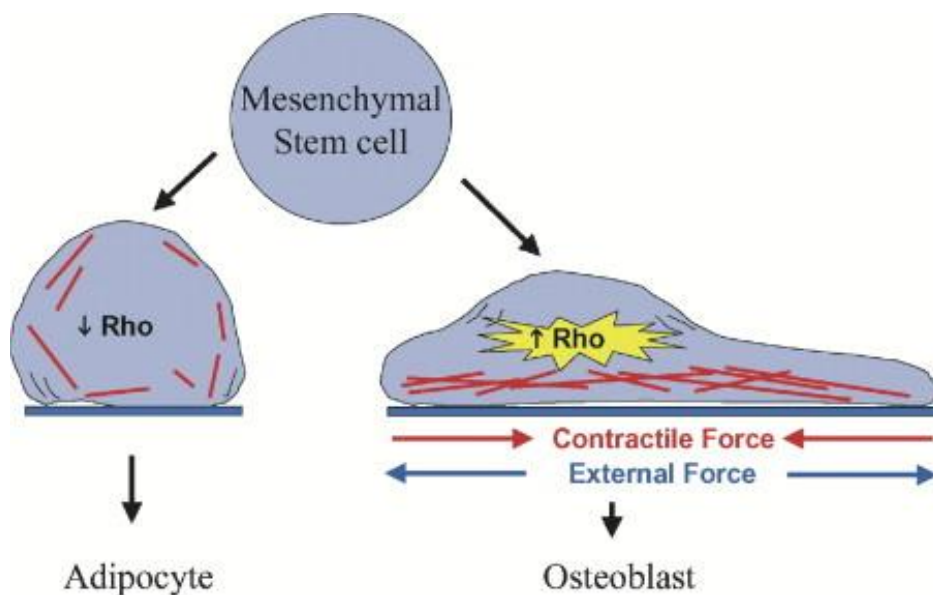


FIGURE 33 : LE CONTROLE DE LA TENSION CELLULAIRE PAR RHOA ORIENTE L'ENGAGEMENT DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES (Settleman 2004)

En ce qui concerne Rac1, il a été montré comme favorisant l'adhérence et l'étalement cellulaire, et de ce fait empêche le changement de forme des cellules et la mise en place de la structure d'actine corticale nécessaire à la formation des adipocytes (Yao, Peng, et Ding 2013). Les cellules adhérentes sont caractérisés par un réseau complexe de fibres de stress et d'adhésions focales, et sont donc plus disposées à adopter une forme de cellule fibroblastique reflétant la tension du cytosquelette (S. Huang, Chen, et Ingber 1998; S. Huang et Ingber 1999), ce qui semble par contre être altéré en cas d'impesanteur.

La forme de la cellule peut également dépendre de la place disponible, et donc de la densité des cellules. Gao et coll. (Gao, McBeath, et Chen 2010) ont constaté que l'activité de Rac1 était significativement plus élevée dans les cellules bien étalées au début de l'ostéoblastogénèse que plus tard, lorsqu'elles sont à haute densité, contrairement aux niveaux d'activité de RhoA qui ne variaient pas de façon sensible. Ils ont également démontré que Rac1 était nécessaire pour l'ostéogénèse et que s'il est constitutivement actif, il inhibe l'adipogénèse (Figure 34). De plus, Liu et coll. (J. Liu et al. 2005) ont montré que l'augmentation de la densité préadipocytaire inhibait l'activité de RhoA, et que cette repression de la voie RhoA/ROCK était nécessaire à la fois pour l'engagement et pour la maturation des adipocytes (McBeath et al. 2004; Sordella et al. 2003). Une densité cellulaire accrue semble donc être, dans ce dernier cas, d'une importance cruciale.

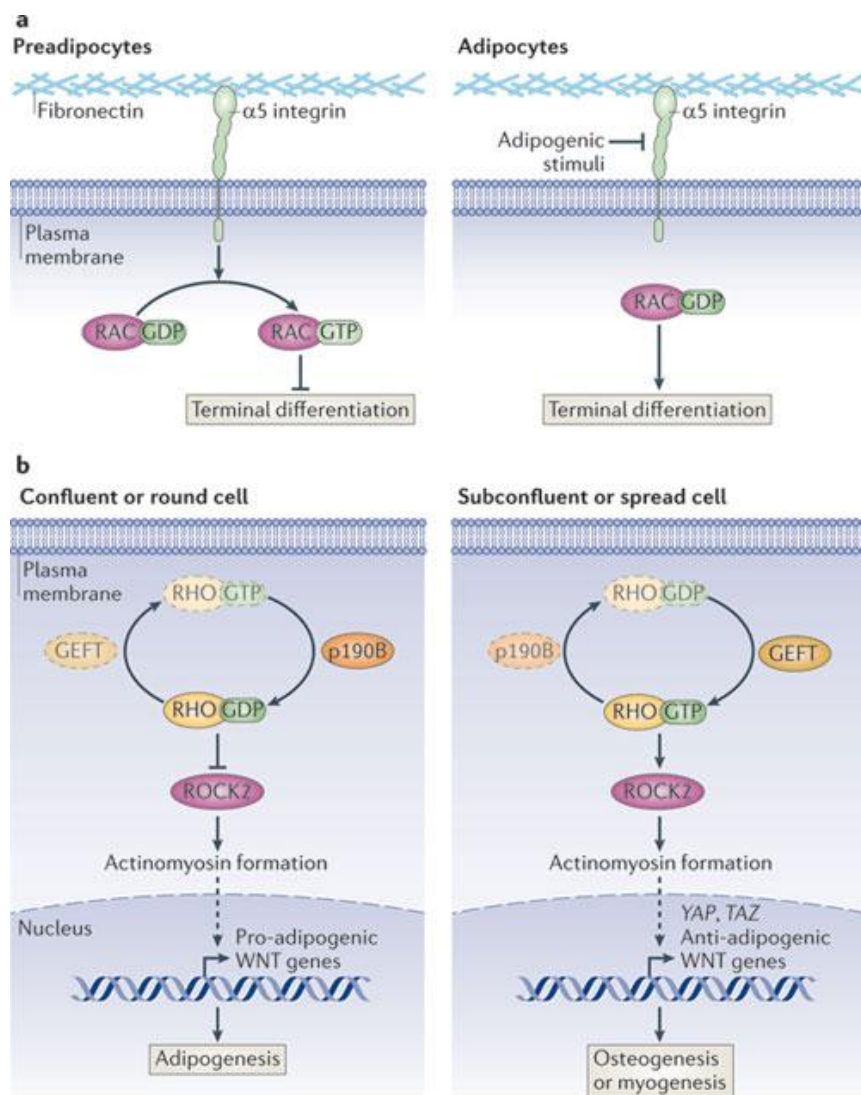


FIGURE 34 : LES RHOGTPASES DANS L'EQUILIBRE ENTRE ADIPOGENESE ET OSTEOGENESE (Cristancho et Lazar 2011)

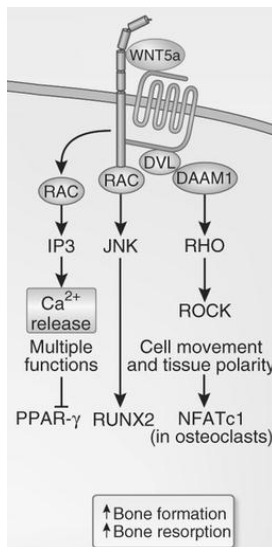


FIGURE 35 : LES RHO GTPASES DANS LA VOIE WNT
D'après (Baron et Kneissel 2013).

De nombreuses voies de signalisation sont régulées par les RhoGTPases, en plus de celles montrées Figure 34, et plusieurs boucles de rétroactions sont associées à leurs voies effectrices. La formation des adhésions focales dépendantes des intégrines, des adhésions cellule-cellule régulées par les cadhérines ou encore l'activation de la voie PI 3-kinase influence la fonction des GEFs et des GAPs modulant les RhoGTPases. Ces boucles de régulation positives et négatives sont importantes pour la forme et la migration de la cellule, mais aussi pour les processus d'engagement des cellules multipotentes.

Un autre voie déterminant est la voie Wnt, intervenant dans le contrôle de la réplication, de la différenciation et de la survie des cellules. Il existe deux types de voies Wnt, la voie canonique (dépendante de la β -caténine) et la voie non-canonique (indépendante de la β -caténine), les deux étant impliquées dans le contrôle de l'équilibre résorption/formation osseuse. La voie canonique passe par la fixation de Wnt sur les co-récepteurs LRP5 (Protéine 5 associée au récepteur des lipoprotéines de faible densité) et Frizzled, qui par des signalisations en cascade, permettent de transloquer la β -caténine vers le noyau et d'induire de nombreux gènes spécifiques (Krishnan, Bryant, et Macdougald 2006).

La voie non-canonique passe elle aussi par Frizzled mais avec d'autre co-récepteur, dont la signalisation résultante active des protéines G, incluant RhoA, et recrutant la signalisation en cascade de la voie NFAT (Facteur nucléaire des lymphocytes T activés) (Katoh et Katoh 2007). Par exemple, dans les voies non-canonique de Wnt le récepteur Dishevelled (Dsh ou DVL) peut former un complexe avec Rac1, activant la kinase Jun (JNK) et donc l'ostéogénèse par induction de son facteur de transcription clé : Runx2. En parallèle, la liaison de Wnt5a à son récepteur Frizzled (FZD) induit Rac1, et augmente la concentration de calcium intracellulaire par la voie de l'inositol 1,4,5-triphosphate de type 3 (IP3), entraînant l'inhibition du gène clé de l'adipogénèse : PPAR γ (Figure 35)(Baron et Kneissel 2013).

2. 4) LA REPONSE DES GTPASES AUX CONTRAINTES MECANIQUES

Les RhoGTPases sont donc impliquée dans l'orientation de l'engagement des CSS. Nous avons vu que la rigidité ou la composition de la matrice extra-cellulaire pouvait moduler leur activité, ainsi que la surface disponible aux cellules. Comment les GTPases réagissent aux différentes contraintes mécaniques ? La transduction cellulaire des signaux mécaniques passe par le cytosquelette qui résiste physiquement aux forces transmises entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule et qui a la possibilité dynamique de réagir à différents types de forces (Figure 36). Les RhoGTPases sont liées au cytosquelette et répondent aux forces mécaniques.

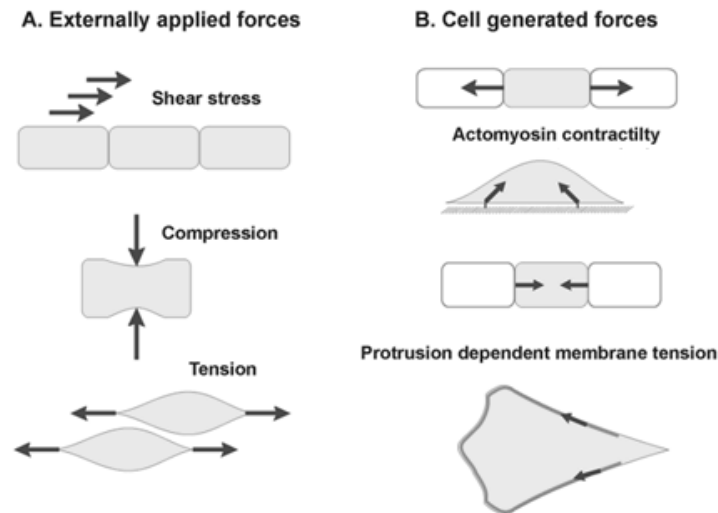


FIGURE 36 : LES DIFFERENTS STRESS MECANIQUES APPLIQUES AUX CELLULES (LESSEY, GUILLUY, ET BURRIDGE 2012)

La contraction du cytosquelette d'actine induite par les contraintes mécaniques résulte souvent en une activation de la signalisation des Rho GTPases :

- **Les stress de cisaillement** : induits par le flux sanguin par exemple, activent RhoA dans les cellules endothéliales (Tzima 2006).
- **La compression** : altère la distribution subcellulaire de RhoA et Rac1 dans les cellules musculaires lisses (Putnam et al. 2003), et induit l'activité de RhoA dans les chondrocytes (D. R. Haudenschild et al. 2010).
- **La tension** : inhibe la formation de lamellipodes dans les cellules musculaires lisses par désactivation de Rac (Katsumi et al. 2002), diminue la quantité de Rho lié à la membrane (Putnam et al. 2003) ou augmente son activité après une contrainte équiaxiale cyclique, en réponse aux forces exercées sur les intégrines (Numaguchi et al. 1999; Guilluy et al. 2011; Zhao et al. 2007).
- **Les tensions générées par les cellules** : la tension intracellulaire engendrée par la migration des cellules induit des boucles croisées de signalisation entre RhoA et Rac1. La forte activité de RhoA engendre une inhibition conséquente de Rac1 dans la majorité de la cellule, afin de maintenir la polarité, en confinant l'activité de Rac1 au niveau du front de migration, loin des zones de hautes tensions cellulaires, médiée par RhoA/ROCK (Houk et al. 2012).

Sous l'effet des contraintes mécaniques, RhoA et Rac1 sont transloquées à la membrane plasmique (Fleming, Elliott, et Exton 1996; Marjoram, Lessey, et Burridge 2014), leur régulation dépendant du type de contrainte (Figure 37).

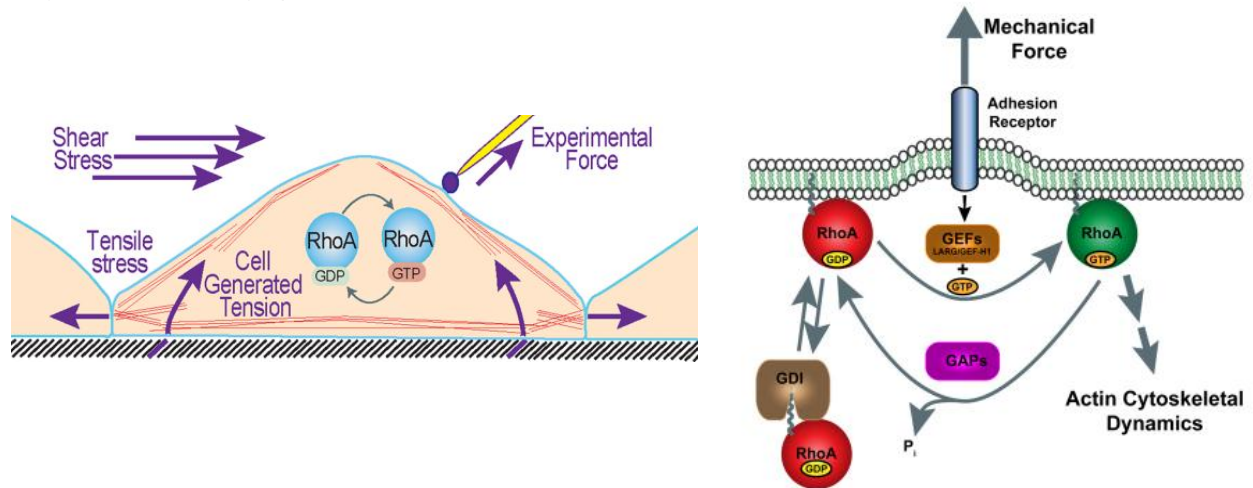


FIGURE 37 : REPONSE DE LA GTPASE RHOA AUX STRESS MECANIQUES

En cas de stress appliqué sur la membrane cellulaire, RhoA est activé (forme liée au GTP) et induit de nombreuses voies de signalisation, dont la dynamique d'actine du cytosquelette. D'après (Lessey, Guilluy, et Burridge 2012; Marjoram, Lessey, et Burridge 2014).

L'activation de RhoA peut activer **la voie des YAP/TAZ**, importante dans la réponse des cellules aux contraintes mécaniques. La voie de signalisation Hippo contrôle la taille des organes chez les animaux en jouant sur la régulation de la prolifération et l'apoptose de leurs cellules. La protéine Yes-associée (YAP) et son co-activateur transcriptionnel à motif de liaison PDZ (TAZ) sont des effecteurs de cette voie Hippo, et permettent la translocation de protéines, par exemple la β -caténine, vers le noyau où elles vont réguler l'expression des gènes (Tschumperlin, Liu, et Tager 2013). La voie YAP/TAZ est importante pour la détection de la rigidité du substrat, ainsi que la forme des cellules. Elle est également nécessaire à la différenciation ostéogénique des CSS, la répression de YAP et/ou TAZ inhibant l'ostéogénèse des CSS ensemencées sur une grande surface rigide, favorisant normalement la différenciation ostéogénique (Dupont et al. 2011).

La localisation cellulaire du facteur de transcription YAP dans les CSS dépend de la rigidité de la matrice extracellulaire, ainsi que des contraintes appliquées à la surface des cellules. Un support mou favorise la localisation cytoplasmique de YAP, tandis qu'une matrice rigide ou des contraintes mécaniques induisent alors sa translocation vers le noyau (Figure 38) (Dupont et al. 2011). L'engagement des CSS en adipocytes ou en ostéoblastes étant dépendant de la rigidité de leur support, l'équilibre d'engagement est aussi régulé par cette voie YAP/TAZ, le contrôle exogène de ces facteurs pouvant mimer, par exemple, un substrat rigide aux cellules. De même, tous les co-facteurs et/ou modifications post-traductionnelles de cette voie YAP/TAZ peuvent contrôler sa translocation, ainsi que la lamine nucléaire (Swift et al. 2013). Cependant, la translocation YAP/TAZ requiert une certaine activité de RhoA pour permettre la tension d'actomyosine du cytosquelette et maintenir un YAP/TAZ nucléaire, contrairement à Rac1, dans les CSS (Dupont et al. 2011). Ainsi, TAZ permet de co-activer les gènes dépendant de Runx2, tout en réprimant les gènes dépendant de PPAR γ (Hong et al. 2005).

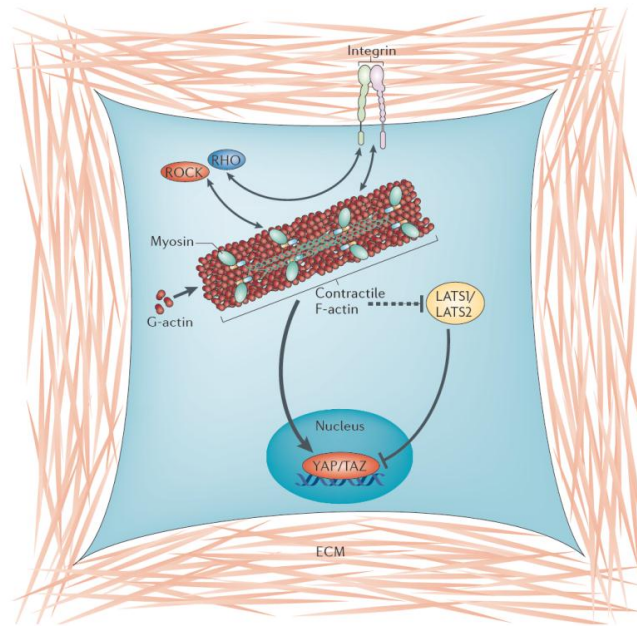


FIGURE 38 : SIGNALISATION DE RHOA DANS LA VOIE YAP/TAZ
D'après (HALDER, DUPONT, ET PICCOLO 2012)

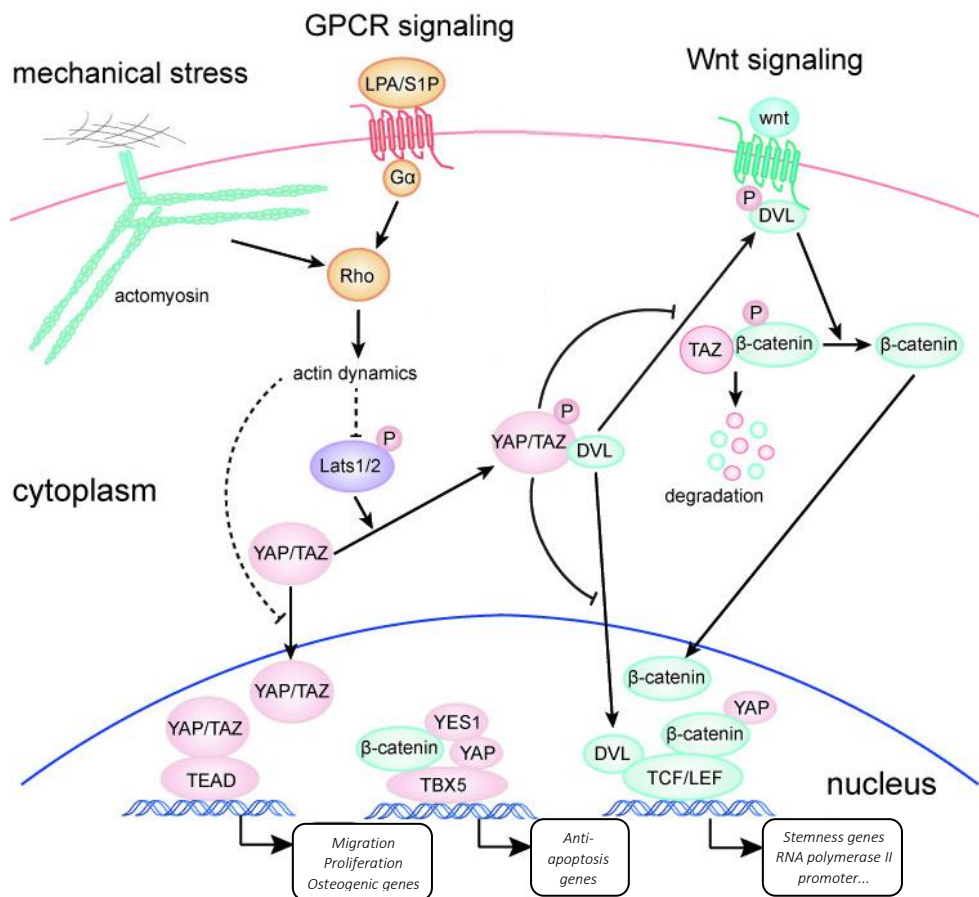


FIGURE 39 : SIGNALISATIONS YAP-TAP A PARTIR DES VOIES GPCR ET WNT
D'après (Guo et Zhao 2013).

De plus, la signalisation YAP/TAZ est en association avec la voie Wnt canonique. Ainsi, une stimulation de la voie Wnt induit la stabilisation de la β -caténine et de TAZ, mais pas de YAP (Figure 39) (Dupont et al. 2011). Il a été proposé que la β -caténine entraînerait ensuite directement sa co-dégradation avec TAZ par ubiquitination, suggérant l'effet fondamental de TAZ sur cette voie. De plus, les YAP/TAZ cytoplasmiques séquestrent la β -caténine dans le cytoplasme en se liant à DVL2 qui induit l'accumulation de la β -caténine en réponse à une stimulation de Wnt (Imajo et al. 2012). Les YAP/TAZ cytoplasmiques ou nucléaires ont finalement des rôles opposés concernant l'activité de la β -caténine, l'inhibant dans le cytoplasme et l'activant dans le noyau.

2. 5) LA CONSEQUENCE DES CONTRAINTES MECANIQUES SUR L'ENGAGEMENT DES CSS

Nous avons vu qu'un stimulus mécanique peut activer les RhoGTPases, augmenter la tension intracellulaire ou stimuler la voie YAP/TAZ. Ces signaux internes contrôlent ensuite les facteurs orientant la division asymétrique des cellules, ou l'expression des gènes liés à l'engagement. Quelles conséquences sont observées sur l'engagement des CSS ?

5) A) AUGMENTATION DES CONTRAINTES MECANIQUES

La différenciation des CSS est affectée par des stimulations mécaniques dynamiques (Engler et al. 2006; Kurpinski et al. 2006; Y. Huang et al. 2012). En particulier, les stimulations mécaniques régulent *in vitro* la croissance des CSS (Riddle et al. 2006), l'organisation de leur cytosquelette, et leur phénotype ostéogénique ou chondrogénique (Mouw et al. 2007; Sharp, Lee, et Goldstein 2009).

La réponse des CSS aux contraintes mécaniques dépend de nombreux paramètres tels que le type de contrainte, son amplitude, sa fréquence, ou encore le temps de récupération entre chaque épisodes de stimulation. De façon non-exhaustive, chez les CSS :

- **Les mouvements oscillatoires** : augmentent de façon transitoire la concentration intracellulaire de calcium, leur taux de prolifération et l'expression des gènes ostéogéniques tels que la phosphatase alcaline (Y. J. Li et al. 2004), Runx2 et Sox9. Arnsdorf et coll. montrent aussi que ces mouvements induisent l'engagement ostéogénique des CSS par la voie RhoA/ROCK, ainsi que par Wnt5a qui induit les voies canoniques (par la β -caténine) et non canoniques (par RhoA) de Wnt (Arnsdorf, Tummala, et Jacobs 2009; Arnsdorf et al. 2009).
- **Les contraintes cycliques** : augmentent Runx2 au dépens de PPAR γ (David et al. 2007).
- **Les forces de traction** : induisent la protéine morphogénétique osseuse 2 (BMP2) (Sumanasinghe, Bernacki, et Lobo 2006).
- **La tension** : régule à la fois les gènes associés à la différenciation fibroblastique qu'ostéogéniques (par la β -caténine) (A. K. Haudenschild et al. 2009).
- **La compression** : induit l'expression des gènes chondrogéniques (A. K. Haudenschild et al. 2009), par la voie TGF β -1 (Facteur de croissance transformant β -1) (C.-Y. C. Huang et al. 2004; Z. Li et al. 2010).

- **La pression hydrostatique** : stimule aussi la différenciation chondrogénique par l'augmentation de l'expression du collagène de type II, des protéoglycanes et de Sox9 (Angele et al. 2003; Miyanishi et al. 2006).

5) B) DIMINUTION DES CONTRAINTES MECANIQUES

En ce qui concerne l'absence de contraintes mécaniques, l'impesanceur réelle ou simulée inhibe d'une part la croissance, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Zayzafoon, Gathings, et McDonald 2004; Meyers et al. 2005; Dai et al. 2007), en induisant d'autre part l'adipogénèse des CSS, comme le montre l'augmentation de l'expression de ses marqueurs, ainsi que PPAR γ (Pan et al. 2008; Zayzafoon, Meyers, et McDonald 2005). Ces effets peuvent être expliqués par l'inhibition de RhoA, qui va bloquer le cycle cellulaire des ostéoblastes en phase G1 (Olson, Ashworth, et Hall 1995; Yamamoto et al. 1993). En plus de la différenciation adipogénique, l'impesanceur induirait la différenciation endothéliale des CSS (Nanding Wang et al. 2014), voire même la différenciation neuronale (J. Chen et al. 2011) !

Parmi les acteurs modulant l'engagement des CSS sous contraintes mécaniques, le rhéostat YAP/TAZ, vu précédemment, est probablement impliqué. Le VEGF et ses différentes signalisations sont aussi sûrement de bons candidats.

2. 6) VEGF, RHOGTPASES ET CONTRAINTES MECANIQUES

6) A) LA REPONSE DU VEGF AUX CONTRAINTES MECANIQUES

Les stimulations mécaniques induisent une induction du VEGF, à la fois dans l'angiogénèse et le remodelage osseux (Hudlicka et Brown 1993). Ce VEGF permet d'augmenter le nombre et la longueur des capillaires environnants, et son expression est dépendante des contraintes mécaniques appliquées.

Ainsi, dans des cellules musculaires squelettiques, des compressions cycliques uniaxiales ou un flux pulsatif induisent l'expression du VEGF dès 1h, augmentant leur taille en réponse au stress mécanique (Juffer et al. 2014). Chez les cellules endothéliales, un stress de cisaillement (flux) active l'expression du récepteur 2 du VEGF, régulée par l'activité des MMPs (dela Paz, Melchior, et Frangos 2013). Ce stress induit aussi l'expression de RhoA (J. W. Song et al. 2012). De même, les progéniteurs endothéliaux se différencient et deviennent adhérents en cas de stress de cisaillement. Cette réponse induit leur expression en marqueurs endothéliaux, (VEGF-R1, VEGF-R2, VE-cadherin, VCAM1...), activant la voie de transduction PI3K/Akt/mTOR, en fonction de l'intensité du stress (Obi et al. 2012). Cette induction du VEGF et du VEGFR2 permettrait aussi d'augmenter leur survie, en limitant leur apoptose par protection contre les stress mécaniques (dela Paz et al. 2012).

En ce qui concerne les CSS, Bai et coll. ont montré qu'elles augmentaient leur différenciation endothéliale en cas de stress de cisaillement, induisant une stimulation à la fois mécanique et chimique, s'il y a présence de VEGF dans leur milieu (Bai et al. 2010). Mais l'expression du VEGF est aussi induite directement chez les CSS par stress mécanique court, activant la voie Akt (Kasten et al. 2010), ainsi que les marqueurs endothéliaux CD31, vWF, VEGF et VEGFR1 (H. Wang et al. 2005).

Le VEGF réagit donc fortement aux stress mécaniques. Quelle isoforme répond particulièrement à la mécanotransduction ? Plusieurs études ont préalablement été réalisées au laboratoire, montrant que

chez les ostéoblastes, c'est l'isoforme matricielle (ARNm et protéine) qui est exprimée en réponse à un stress mécanique de faible amplitude et de haute fréquence (Dumas et al. 2009). Plus précisément, il existe une corrélation négative entre la production de VEGF soluble et la fréquence du stress mécanique et une corrélation positive entre la production de VEGF matriciel et cette fréquence. L'expression des isoformes humaines du VEGF soluble (121, 165) est spécifiquement induite sous basse fréquence tandis que les isoformes du VEGF matriciel (206, 189, 165, 145) sont spécifiquement augmentées sous haute fréquence chez les ostéoblastes (Faure et al. 2008). Le VEGF matriciel, sécrété par les osteoblastes, permettrait de mieux résister à l'apoptose en induisant en parallèle la migration des cellules endothéliales environnantes (Faure et al. 2010).

En cas d'absence de stress mécanique, le VEGF semble aussi être important dans la réponse des cellules à l'impesanteur. L'équipe de Zhang a montré qu'en ajoutant du VEGF dans le milieu de culture de CSS en impesanteur simulée, celles-ci se différenciaient plus fortement en cellule endothéliales (induction de Flk-1 et vWF), et sont capables de former un réseau capillaire (Xiaofeng Zhang et al. 2013).

De plus, de façon intéressante, l'expression de l'isoforme matricielle du VEGF est assez réduite en impesanteur chez les ostéoblastes, alors que les isoformes solubles sont augmentées. L'extinction de Rac1 permet de limiter cette surexpression de VEGF soluble. Cependant, elle ne permet pas de restaurer une expression normale de VEGF matriciel en impesanteur.

Néanmoins, la voie VEGF/RhoGTPase pourrait avoir un rôle important dans la perception et la signalisation en réponse à un changement de gravité (Alain Guignandon et al. 2014).

6) B) LE RÔLE DES RHOGTPASES DANS LES VOIES DU VEGF

Les GTPases étant fortement impliquées dans la réponse cellulaire aux contraintes mécaniques, leur apparition dans la signalisation du VEGF pourrait expliquer les conséquences observées sur sa régulation.

Beaucoup de données existent sur la signalisation des GTPases dans la vascularisation, mais peu sont disponibles sur un autre type cellulaire que les cellules endothéliales. La stimulation des cellules endothéliales par le VEGF induit la forme active de RhoA (Boer et al. 2004; Bryan et al. 2010; Nan Wang et al. 2013). Cette signalisation par RhoA est essentielle pour l'angiogénèse dépendante du VEGF *in vivo* et pour la formation de capillaires *in vitro* (Nobes et Hall 1995; Cornali et al. 1996; Sun et al. 2006).

Le lien entre le VEGF et les GTPases a été mis en évidence par la signalisation du complexe VEGF/Flk-1, induisant les kinases des adhésions focales (FAK) ainsi que les Src, et entraînant l'activation de RhoA (Gille et al. 2001; van Nieuw Amerongen et al. 2003) et de sa kinase ROCK (Boeuf et al. 2006). De plus, une surexpression de Rac1 a été montrée comme induisant la libération du calcium intracellulaire. Ce processus, dépendant du VEGF, permet la migration des cellules vasculaires des muscles lisses, par le biais de Flt-1 dont la stimulation est induite par Rac1 via la signalisation PI3K (Zeng, Zhao, et Mukhopadhyay 2002).

L'action spécifique des isoformes du VEGF sur les GTPases reste cependant inconnue. L'équipe de Chen a seulement montré l'activation de Flk-1 dans des cellules en contact avec du VEGF matriciel, en association avec les intégrines $\beta 1$ et les adhésions focales (T. T. Chen et al. 2010), comme déjà vu

précédemment dans ce manuscrit, activation absente avec du VEGF soluble, qui pourrait peut être faire le lien avec les GTPases.

En ce qui concerne les CSS, l'équipe de Wang a montré que l'inhibiteur de la voie Rho/ROCK bloque leur différenciation endothéliale induite par le VEGF (Nan Wang et al. 2013). La signalisation VEGF/GTPases est donc aussi importante chez les CSS et est nécessaire à leur différenciation endothéliale.

2. 7) SYNTHÈSE

L'équilibre de différenciation entre adipocytes et ostéoblastes est régulé de manière compétitive, avec l'intervention de nombreux facteurs. Parmi ces facteurs, les contraintes mécaniques sont cruciales, les cellules souches squelettiques étant des cellules mécanosensibles. Leur réponse va dépendre de nombreux paramètres tels que le type de contrainte, son amplitude ou sa fréquence. En général, une contrainte mécanique va entraîner une induction du taux de prolifération et de l'expression des gènes ostéogéniques. L'absence de contrainte mécanique induit au contraire l'adipogénèse et inhibe la croissance, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes.

La transduction cellulaire des signaux mécaniques passe par le cytosquelette et est souvent due à une activation de la signalisation des Rho GTPases. Sous l'effet de contraintes mécaniques, RhoA et Rac1 transloquent à la membrane et activent plusieurs voies de régulations. RhoA peut ainsi moduler la localisation cellulaire du facteur de transcription YAP dans les CSS. Ce facteur dépend de la rigidité de la matrice extracellulaire, ainsi que des contraintes appliquées à la surface des cellules, et sa translocation vers le noyau induit les gènes ostéogéniques. Cette régulation est très dépendante de l'activité de RhoA qui permet la tension d'actinomyosine du cytosquelette et le maintien des YAP/TAZ nucléaires, TAZ co-activant les gènes dépendant de Runx2, tout en réprimant les gènes dépendant de PPAR γ (Figure 40).

En ce qui concerne le lien entre le VEGF et les GTPases, la signalisation du complexe VEGF/Flk-1, induit l'activation de la voie RhoA/ROCK. Cette voie peut être activée par un stress mécanique court, où l'isoforme matricielle est exprimée proportionnellement à la fréquence utilisée. De même, cette isoforme est inhibée en impesanteur, alors que les isoformes solubles sont induites.

Tout ceci met en évidence la voie VEGF/RhoGTPase comme acteur important dans la mécanotransduction des cellules.

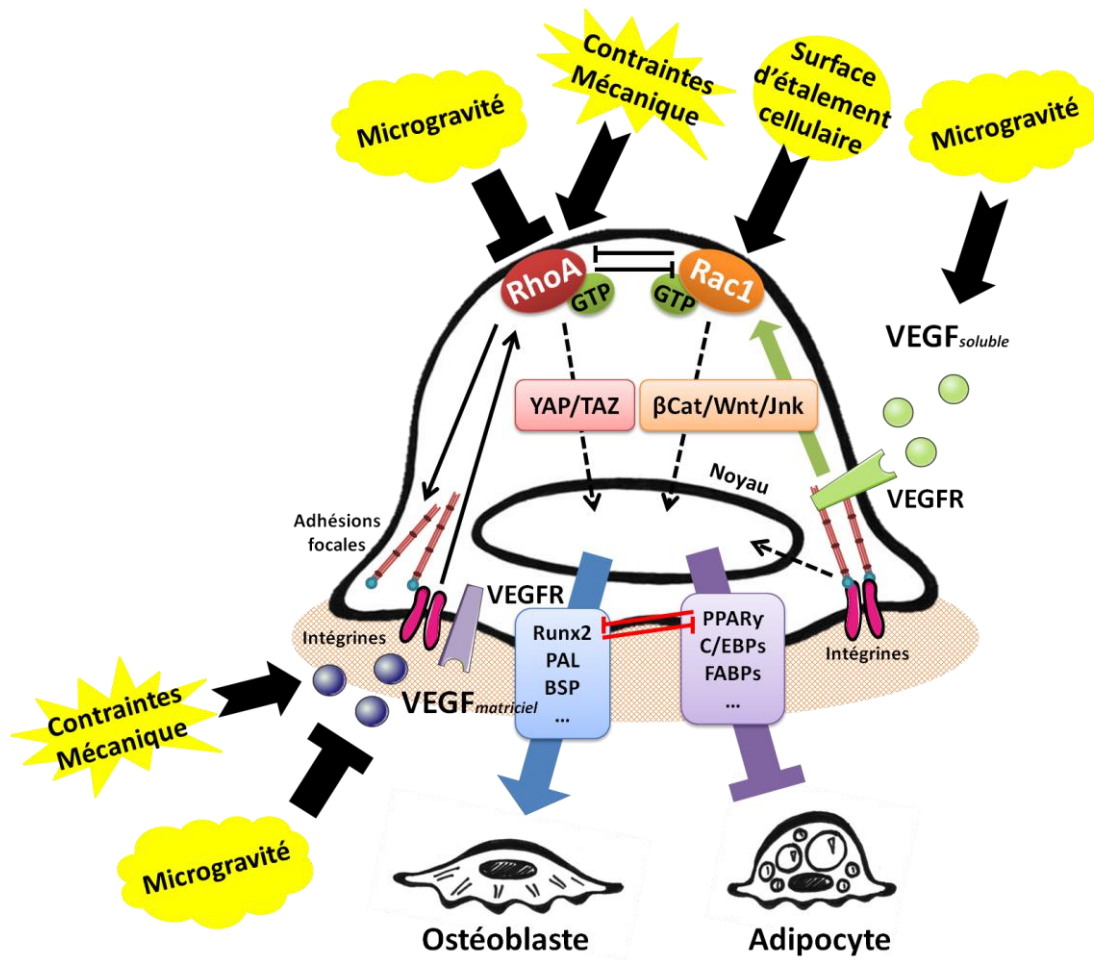


FIGURE 40 : L'IMPACT DES CONTRAINTES MÉCANIQUES SUR LES CSS

B. 3. LA BIOLOGIE DES CELLULES SOUCHES SQUELETTIQUES ET LE STRESS OXYDANT

3. 1) LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

Les systèmes aérobie sont continuellement soumis à des pressions oxydatives qui conduisent parfois, à partir de l'oxygène moléculaire diatomique (O_2), à la formation d'espèces partiellement réduites : les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Un stress oxydant est observé lorsque la production des ERO dépasse les capacités de défense des tissus. Il entraîne des altérations des composants cellulaires, dues aux réactions chimiques des ERO avec les lipides, les protéines, les acides nucléiques cellulaires ou encore certains cofacteurs enzymatiques.

Les ERO sont sous forme de radicaux libres ou de molécules. Elles ont la particularité de porter un électron célibataire (ou non apparié) sur leur couche externe, ce qui les rend généralement instables et capables de réagir plus ou moins rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes. Les réactions de transfert d'électrons produites (réactions d'oxydoréduction) conduisent souvent à la formation d'un nouveau radical, ce phénomène pouvant se propager par des réactions en chaîne. Les réductions mono-électroniques successives de l'oxygène donnent naissance à différentes ERO : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) de courte durée de vie (Avery 2011).

Les principales sources d'ERO dans la cellule sont la mitochondrie, organite producteur d'énergie indispensable pour le fonctionnement de toute cellule (Balaban, Nemoto, et Finkel 2005), la NADPH oxydase, enzyme transférant les électrons à travers la membrane (Bedard et Krause 2007), et le peroxysome, organite dégradant les acides gras à longues chaînes (Antonenkova et al. 2010). Une autre source importante des ERO est située au niveau des contacts focaux. En réponse à plusieurs types de signaux, les récepteurs tyrosine kinase membranaires des cellules entraînent la production d'ERO intracellulaires après stimulation au niveau des intégrines (Chiarugi et al. 2003). Il existe encore de nombreuses autres sources d'ERO telles que la lipoxigénase, la cyclooxygénase, et le cytochrome P450, enzyme localisée dans le réticulum endoplasmique.

Contrairement à la plupart des autres sources d'ERO, ceux générées par la NADPH oxydase (NOX) ne sont pas des déchets métaboliques mais représentent sa fonction biologique première. Les membres de la famille Nox sont des protéines transmembranaires qui transportent des électrons à travers la membrane biologique afin de réduire l'oxygène en $O_2^{\cdot-}$. Leur activation nécessite l'assemblage de sous unités additionnelles comme une protéine membranaire stabilisatrice (p22phox), et des protéines cytosoliques activatrices (p67phox et la RhoGTPase Rac1) ou organisatrices (p47phox)(Figure 41)(Cai, Griendling, et Harrison 2003)

Toute cellule génère des ERO en conditions basales, dont l'un des rôles peut être de participer à la signalisation cellulaire. La concentration en ERO détermine leurs effets cellulaires. Une production relativement modérée d'ERO associée à une élimination efficace peut induire une augmentation modérée, aiguë et transitoire de leur concentration, les ERO pouvant alors modifier de manière réversible certaines molécules environnantes et induire une modification de l'activité des protéines (Morel et Barouki 1999). En revanche, un excès de production d'ERO ou une diminution de l'activité des systèmes anti-oxydants conduisent à la mise en place d'un stress oxydant : les modifications des

molécules environnantes sont alors non spécifiques et irréversibles, ce qui entraîne une stimulation chronique des voies de signalisation (Dröge 2002).

C'est dans ce contexte que les ERO deviennent toxiques et sont impliquées dans le vieillissement et certaines pathologies.

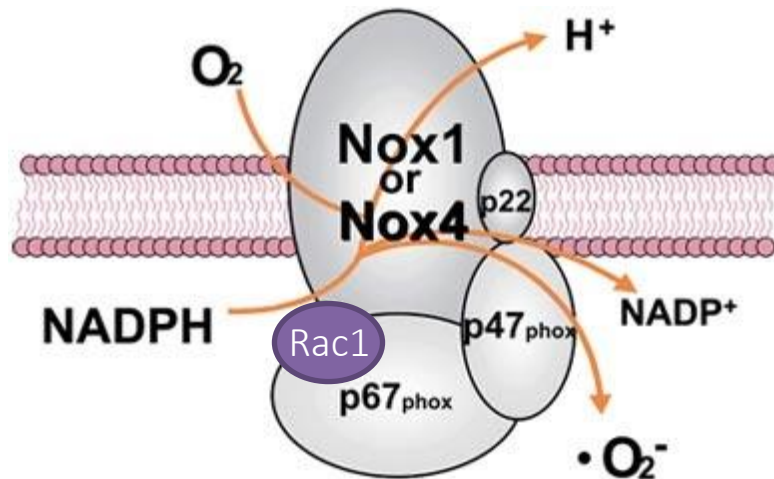


FIGURE 41 : LA NADPH OXYDASE, SOURCE D'ERO INTRACELLULAIRES
(Cai, Griendling, et Harrison 2003)

Etant extrêmement dangereuses et en même temps indispensables à la vie, les ERO forment donc un véritable paradoxe. Une des explications réside dans le fait que les réponses cellulaires varient de manière très sensible et très différente en fonction de la nature chimique, du niveau de production ou encore du site subcellulaire producteur d'ERO.

3. 2) LES SYSTEMES DE DEFENSES ANTIOXYDANTS

Au sein de la cellule, tous les processus utilisant de l'oxygène dans les différents compartiments subcellulaires vont produire des ERO (Figure 42). Afin de limiter leur concentration, les cellules sont équipées de divers systèmes anti-oxydants qui agissent de plusieurs manières : en inhibant la formation des ERO (la séquestration des métaux de transition empêche la réaction de Fenton et la production de HO°), en les métabolisant grâce à des enzymes (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase) ou à des piègeurs de radicaux libres (glutathion, vitamine C, vitamine E, coenzyme Q) ou encore, en réparant les dommages oxydatifs (par des molécules, glutathion et thiorédoxine réduite, capables de réduire les résidus cystéine préalablement oxydés par les ERO) (Gutteridge 1994).

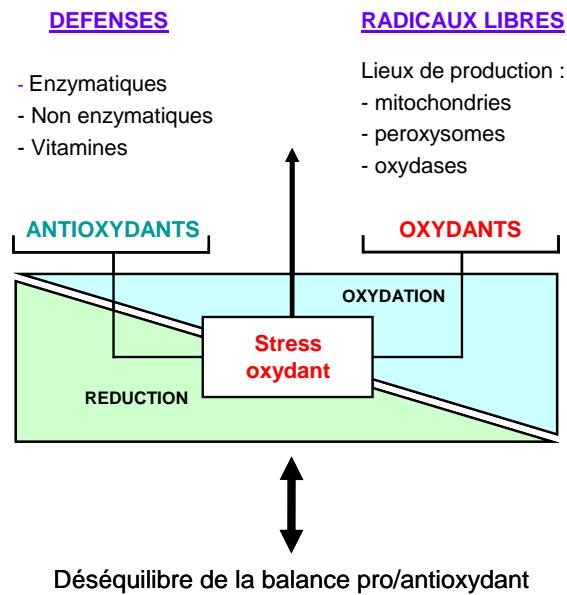


FIGURE 42 : LE STRESS OXYDANT: UN DESEQUILIBRE DE L'EQUILIBRE PRO/ANTIOXYDANTS

A droite de l'équilibre sont représentées les sources d'ERO et à gauche les défenses antioxydantes. Une diminution des défenses antioxydantes ou une augmentation de la production des ERO causera un stress oxydant (Manuscrit Thèse Carole Fournier).

Cette réponse antioxydante est activée grâce à l'activité d'un facteur de transcription : Nrf2 (NF-E2-related factor 2). La voie de signalisation de ce facteur permet de réguler les ERO endogènes. Nrf2 se lie à un site de reconnaissance à l'ADN appelé ARE pour « Antioxidant Responsive Elements » et qui est présent dans les régions régulatrices des enzymes antioxydantes. Nrf2 est constitutivement actif et son activité sera surtout augmentée par stabilisation de la protéine. Cette stabilisation est permise par Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) qui inhibe son ubiquitination et donc sa dégradation par le protéasome. Nrf2 est également activé par phosphorylation (Cho et al. 2007). C'est aussi un facteur de transcription du gene Hace1 (HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase 1), dont la protéine produite se lie et ubiquitine Rac1 lorsque ce dernier est associé à la NOX, bloquant ainsi sa production d'ERO (Cho et al. 2007; Daugaard et al. 2013).

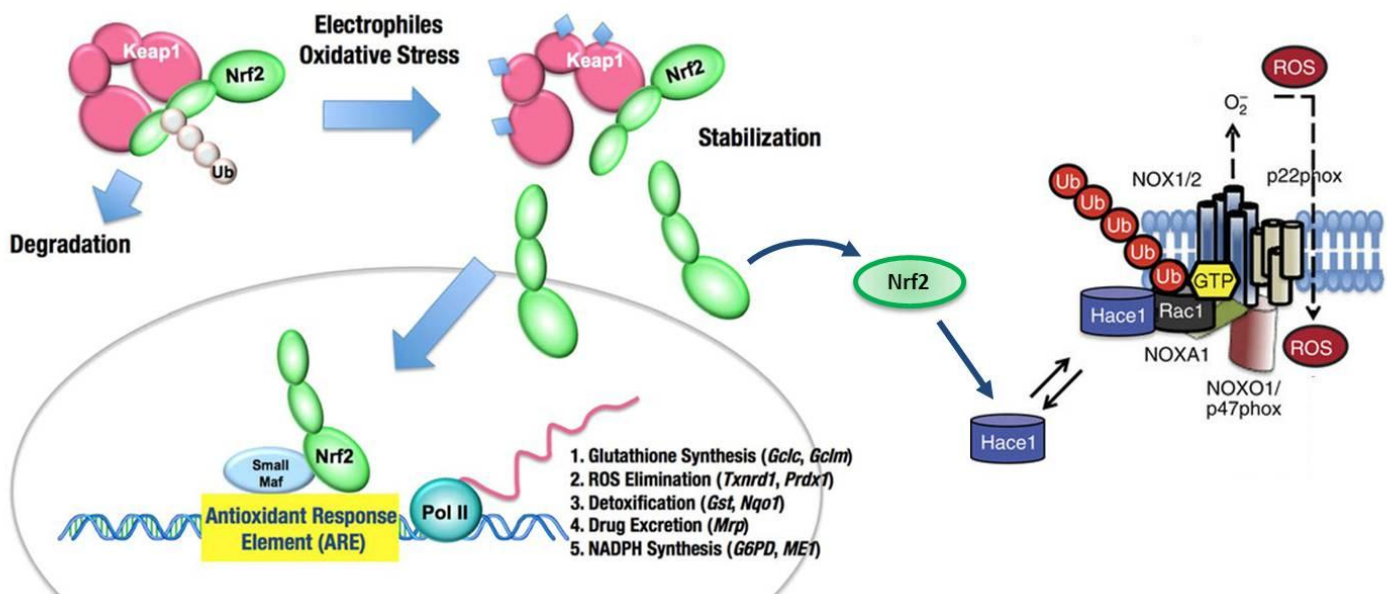


FIGURE 43 : NRF2, LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION MAJEUR DE LA REPONSE ANTIOXYDANTE
D'après (Mitsuishi, Motohashi, et Yamamoto 2012; Daugaard et al. 2013)

3. 3) STRESS OXYDANT ET DIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES SQUELETTIQUES

Un environnement oxydant comme celui présent au cours du vieillissement ou pendant les vols spatiaux, du fait de l'impesanteur (Versari et al. 2013; Stein 2002), et des radiations cosmiques (Testard et al. 1996), peut influencer le maintien des caractéristiques des CSS.

3) A) LE STATUT OXYDANT ET LA PROLIFERATION CELLULAIRE DES CSS

Avec le vieillissement la capacité des CSS à proliférer diminue en association avec l'augmentation des dommages oxydatifs, dûs à la baisse des défenses antioxydantes (Stolzing et al. 2008). D'une manière générale, les ERO présentes en faible concentration favorisent la prolifération cellulaire alors qu'en excès, elles mènent à un stress oxydant induisant l'arrêt de la progression du cycle cellulaire puis la sénescence répliative (Giorgi et al. 2010). Ainsi, Nrf2 a été récemment démontré, dans les cellules cancéreuses, comme redirigeant les voies du glucose et de la glutamine en voies anaboliques afin d'induire les activités métaboliques permettant la prolifération cellulaire. Nrf2 maintient un taux faible d'ERO et favorise l'activation de la signalisation PI3K/Akt (Figure 44) (Mitsuishi et al. 2012).

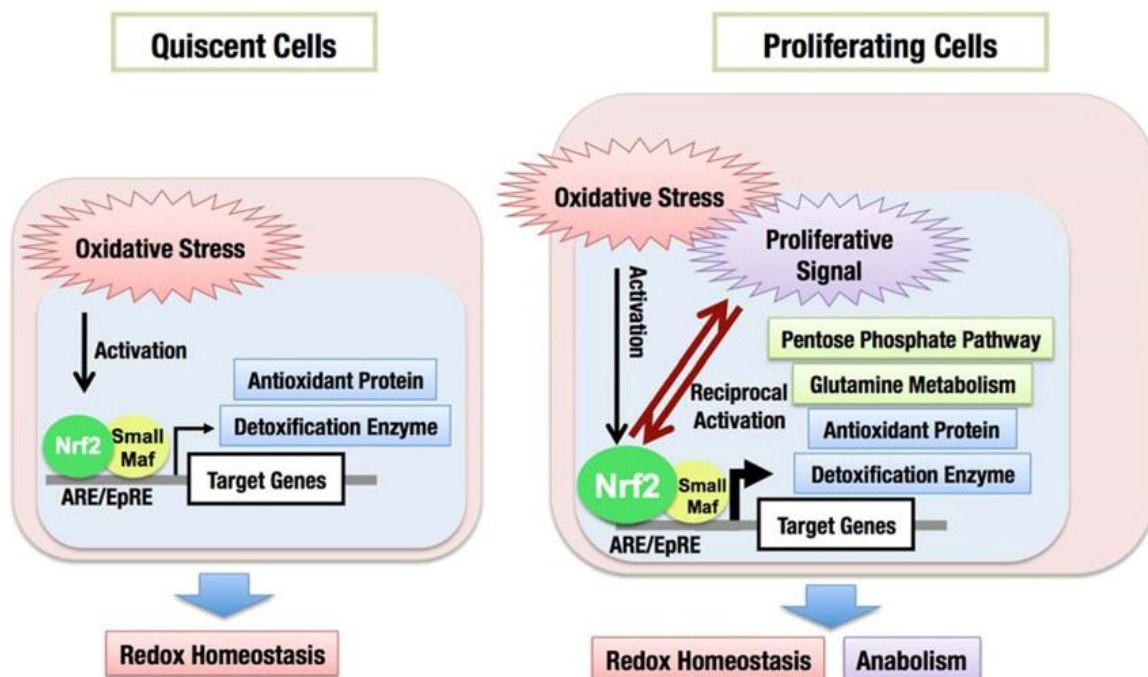


FIGURE 44 : NRF2 INDUIT LE METABOLISME PROLIFERATIF VIA LES VOIES DU GLUCOSE ET DE LA GLUTAMINE (Mitsuishi, Motohashi, et Yamamoto 2012)

Par ailleurs, les ERO produits au niveau des contacts focaux sont importants pour la signalisation des intégrines, et permettent l'adhésion et l'étalement cellulaire (Chiarugi et al. 2003). De plus, les adhésions focales induisent, en associant les intégrines $\beta 1$ aux ERO, l'expression des gènes impliqués dans la production de la matrice et son remodelage (Shi-wen et al. 2012). Les ERO modulent l'adhésion cellulaire, ainsi que la formation des fibres de stress. Elles peuvent moduler la tension cellulaire, la réorganisation du cytosquelette, la croissance, la prolifération et la synthèse d'ADN dans de nombreuses cellules (Gozin et al. 1998). En revanche, l'équipe de Song montre qu'en ce qui concerne les CSS, la génération d'ERO inhibe plutôt l'adhésion en interagissant avec les complexes

d'adhésion focales (H. Song et al. 2010). Ceci va dans le sens de l'excès d'ERO qui produit l'arrêt de la progression du cycle cellulaire puis la sénescence répliative (Giorgi et al. 2010).

Ainsi, une faible concentration d'ERO induit la prolifération des CSS, tandis qu'une moyenne concentration peut entraîner un passage en différenciation, et une trop grande concentration provoque des dommages cellulaires.

3) B) LE STATUT OXYDANT DANS LA DIFFERENCIATION OSTEOBLASTIQUE

Pour former la matrice minéralisée, l'ostéoblaste mature a besoin d'apports énergétiques importants. Cet apport peut être fourni soit par la glycolyse soit par la phosphorylation oxydative. Sachant que la respiration mitochondriale produit 17 fois plus d'ATP par mole de glucose que la respiration anaérobie, c'est donc la mitochondrie qui est la plus sollicitée chez les ostéoblastes. Au cours de la différenciation ostéoblastique, le métabolisme cellulaire évolue donc en passant d'une production énergétique glycolytique à une production énergétique aérobie (C.-T. Chen et al. 2008). Par ailleurs, Mandal et coll. a aussi montré que les pré-ostéoblastes exprimaient majoritairement Nox4 parmi les différents membres de la famille des NADPH oxydases, et que la production d'ERO qui en découle serait nécessaire à l'induction par la BMP-2 de l'activité de la phosphatase alcaline (Mandal et al. 2011).

La mitochondrie étant une source d'ERO majeure, et avec une forte expression de la Nox4, l'ostéoblaste a besoin d'une protection antioxydante efficace pour survivre. Cette protection est permise par l'induction progressive de la catalase et de la superoxyde dismutase 2 durant l'ostéoblastogenèse (C.-T. Chen et al. 2008). De plus, la β -caténine impliquée dans l'ostéogénèse est aussi un coactivateur essentiel permettant l'activité de FoxO (Forkhead-box class O) (Essers et al. 2005), un facteur de transcription régulant l'expression des enzymes antioxydantes. De plus, l'activité de FoxO, qui est dépendante de sa phosphorylation, est aussi régulée par l'état oxydant de la cellule via l'oxydation et la réduction de résidus cystéines contenus dans certaines kinases et phosphatases (Myatt, Brosens, et Lam 2011).

L'ostéoblaste se caractérise par une forte production d'ERO, limitée par un système antioxydant très efficace permettant la différenciation ostéoblastique.

3) C) LE STATUT OXYDANT AU COURS DE LA DIFFERENCIATION ADIPOGENIQUE

Plusieurs études montrent que le niveau d'ERO augmente au cours de l'adipogenèse, avec en parallèle une accumulation des lipides intracellulaires et un statut devenant de plus en plus oxydant (Saitoh et al. 2010). La provenance des ERO s'explique par la forte biogenèse mitochondriale observée au cours de l'adipogénèse (Zoncu, Efeyan, et Sabatini 2011). L'activation de PPAR γ induit l'augmentation du contenu mitochondrial (Koh et al. 2009) et l'expression de PGC-1 α (Coactivateur du récepteur γ de la prolifération du péroxysome activé) croît au cours de l'adipogenèse (Ducluzeau et al. 2011), ceci étant plus fortement marqué chez les adipocytes bruns. La NADPH oxydase est aussi une source importante d'ERO chez l'adipocyte et l'adipogenèse induite par l'insuline stimule l'expression génique des Nox1 et 4 (Schröder et al. 2009).

La génération d'ERO élevée au cours de différenciation adipocytaire suggère que les adipocytes nécessitent une protection antioxydante particulièrement efficace afin de survivre à cet

environnement. PPAR γ est impliqué dans la mise en place des mécanismes de défense contre le stress oxydant. Il régule l'expression de plusieurs enzymes antioxydantes en association avec PGC-1 α pendant l'adipogénèse (Ducluzeau et al. 2011; Yoo, Chang, et Rho 1999). De plus, les adipocytes différenciés sont moins sensibles à l'apoptose induite par les ERO que les pré-adipocytes (Kojima et al. 2010). Ceci suggère que la résistance au stress oxydant s'effectue progressivement au cours de l'adipogénèse, les CSS n'ayant pas assez de défenses s'orientant préférentiellement en adipocytes.

3) D) L'EFFET DES OXYDANTS SUR LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE

L'exposition d'ostéoblastes à des ERO diminue l'activité de la PAL et de l'expression de l'ostéocalcine (Zhong, Bai, et Chen 2009), et l'ajout exogène d'H₂O₂ dans des cultures inhibe en plus la minéralisation (Lee et al. 2006). L'augmentation des ERO intracellulaires induite par une forte concentration de glucose induit l'expression de PPAR γ et la différenciation adipocytaire de cellules souches dérivées de tissu adipeux ou de muscles alors que l'expression de l'ostéocalcine et de l'ostéopontine est inhibée (Aguari et al. 2008). Par ailleurs, l'insuline induit une production d'ERO via l'activation de la NADPH oxydase, de Nox4 particulièrement. La sous expression de Nox4 conduit à une diminution de la génération intracellulaire d'ERO et à l'inhibition de l'adipogénèse (Schröder et al. 2009).

Ces résultats suggèrent que les ERO ont un effet favorable sur l'adipogénèse et défavorable sur l'activité ostéoblastique. Leur production locale et maîtrisée semble être indispensable en début d'ostéoblastogénèse comme cela a été vu précédemment.

3) E) ERO ET GTPASES

Les principales sources de production de ERO cellulaire sont les enzymes qui modulent le statut oxydant telles que la NOX, l'oxyde nitrique synthase (NOS), et la superoxyde dismutase (SOD). Les RhoGTPases, en particulier Rac1 et 2, sont nécessaires à l'activation du complexe NOX et à la génération d'ERO (anion superoxyde, O₂^{•-}). Lors de l'activation par des signaux extracellulaires, le complexe NOX est assemblé à la membrane cellulaire où Rac1 (lié au GTP et éventuellement au GDI) est recruté pour générer les ERO (Hordijk 2006). Rac1 a également été montré comme interagissant directement avec l'enzyme NOS pour réguler la production de l'oxyde nitrique (NO) (Di-Poi et al. 2001). De plus, il interagirait aussi, d'une manière dépendante du statut oxydatif de la cellule, avec l'enzyme SOD, qui catalyse la conversion de l'O₂^{•-} en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Harraz et al. 2008). Dans des conditions similaires à celles d'une cellule (réductives), Rac-GTP se lie à la SOD, ce qui lui permet de rester à l'état actif et induire la production d'O₂^{•-} par la NOX. Dans des conditions oxydatives, comme en cas de présence locale d'O₂^{•-} ou d' H₂O₂, Rac se dissocie de la SOD, et se convertit en forme inactive (liée au GDP), probablement par l'action d'un GAP spécifique (Harraz et al. 2008). Ces études indiquent que les RhoGTPases peuvent générer une multitude d'intermédiaires réactifs de l'oxygène qui, à leur tour, entraînent de nombreuses modifications de protéines.

A l'inverse, récemment, les ERO apparaissent aussi comme médiateurs essentiels de la signalisation de RhoA et Rac1 en modifiant de façon covalente des résidus cystéine spécifiques. L'équipe de Heo a publié plusieurs études sur l'impact des ERO sur les GTPases. Les ERO, notamment l'anion superoxyde (O₂^{•-}), peuvent activer la libération du GDP au sein des GTPases (par exemple Rac1 et RhoA) et ainsi moduler leur activité. La sensibilité à l'oxydo-réduction de ces RhoGTPases est due à la présence d'un motif GXXXXGK(S/T)C d'activité redox situé au niveau de la boucle permettant la liaison et la phosphorylation du GDP. Bien que les deux GTPases contiennent le motif de réponse aux ERO (GXXXXGK (S/T)C), RhoA possède une cystéine supplémentaire (Cys20), qui peut être oxydée,

entraînant la formation d'un pont disulfure intramoléculaire, qui empêche la liaison du GTP et provoque donc son inactivation (Heo et al. 2006). L'activation de Rac1 peut également induire l'inactivation de RhoA via l'inhibition, dépendante des ERO, d'une protéine tyrosine phosphatase (Nimnual, Taylor, et Bar-Sagi 2003). Ainsi, les agents d'oxydo-réduction peuvent réguler négativement l'activité de RhoA dans des conditions qui stimulent l'activité de Rac1 (Heo et Campbell 2005). De plus, la voie RhoA/ROCK peut aussi induire la phosphorylation de la p47 phox, l'un des composants du complexe NOX, entraînant la limitation des ERO par inactivation de la NOX (Moon et al. 2013). En vue de ces différentes études, la présence d'ERO au sein des cellules peut expliquer les différentes interactions croisées retrouvées entre RhoA et Rac1 (Figure 45)(Sander et al. 1999; Heo 2010).

Finalement, RhoA régule aussi la production des espèces réactives de l'azote (RNS) en réprimant l'expression de l'eNOS (El Remessy et al. 2010) et de l'iNOS (Muniyappa et al. 2000) donc la production des RNS. De même, les RNS activent aussi RhoA en retour (El Remessy et al. 2010).

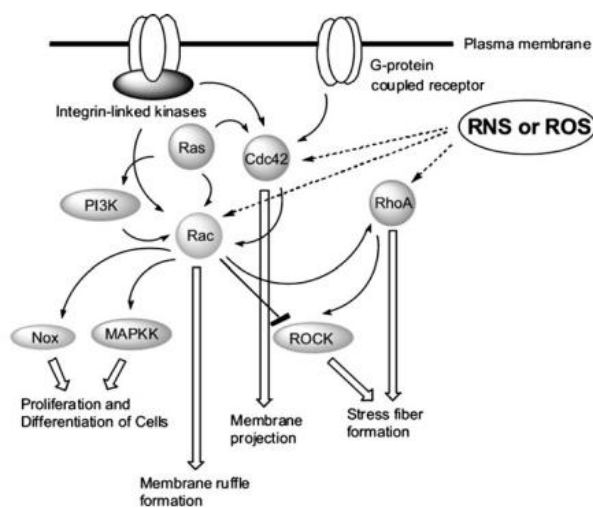
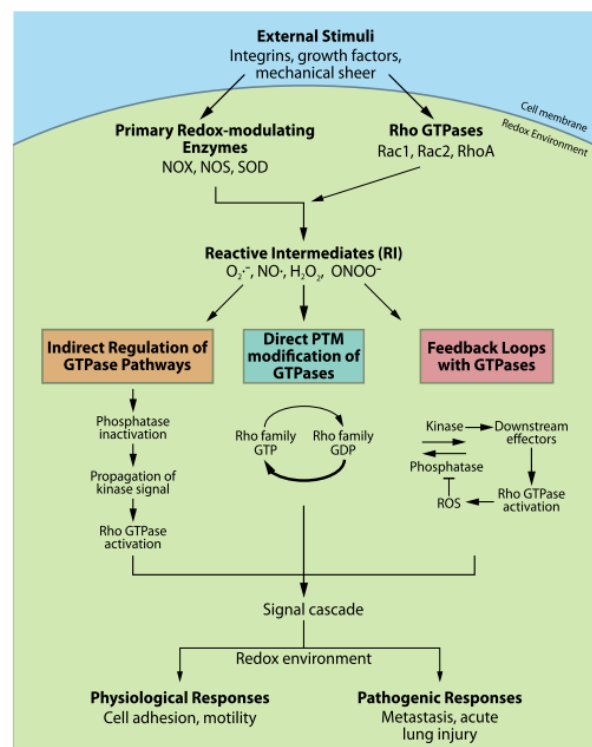


FIGURE 45 : SIGNALISATIONS CROISEES ENTRE LES GTPASES ET LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (Heo 2010) + Newsletter Cytoskeleton June 2014



Par ailleurs, de nombreuses études ont montré l'impact de la matrice extracellulaire sur la différenciation des CSS (Settleman 2004; J. Liu et al. 2005). Cependant, les voies de signalisation qui permettent de transmettre l'information environnementale de la matrice par interaction entre les protéines qui la composent et les intégrines de la membrane cellulaire ne sont pas encore toutes élucidées. Des ERO comme le peroxyde d'hydrogène ou l'ion superoxyde ont été montrés agissant comme second messager lors de processus tels que l'adhésion (Trappmann et al. 2012), l'étalement (Taddei et al. 2007) ou la migration cellulaire (Ushio-Fukai 2008). Ces fonctions sont aussi régulées par le biais des adhésions focales et des complexes focaux, et plus particulièrement les intégrines α et β , elles-mêmes modulées par les ERO (Ushio-Fukai 2008). Ainsi, la production de ROS réduit l'expression des intégrines αv et $\beta 3$, alors que la surexpression de ces intégrines induit la forme réduite du glutathion (GSH), indiquant leur rôle inhibiteur sur le stress oxydant (Thews et al. 2009). Or, les processus cellulaires intervenant dans la dynamique du cytosquelette ou la migration sont régulés par les GTPases (Voir Revue p.93). Dans ce sens, l'équipe de Lin a montré l'année dernière (L.-J. Lin et al.

2013) que le facteur de croissance des plaquettes (PDGF) pouvait induire la production d'ERO au niveau des adhésions focales, en passant par l'activation de Rac1. Et RhoA, en induisant les intégrines $\alpha\beta3$, peut inhiber cette production d'ERO locale et donc réguler l'adhésion et la migration cellulaire en agissant sur les complexes focaux directement. De la même façon, certaines protéines de la matrice extracellulaire peuvent jouer sur les intégrines et ainsi réguler la production d'ERO intracellulaires, ajoutant ainsi d'autres sources d'ERO pouvant moduler la différenciation cellulaire des CSS (Figure 46).

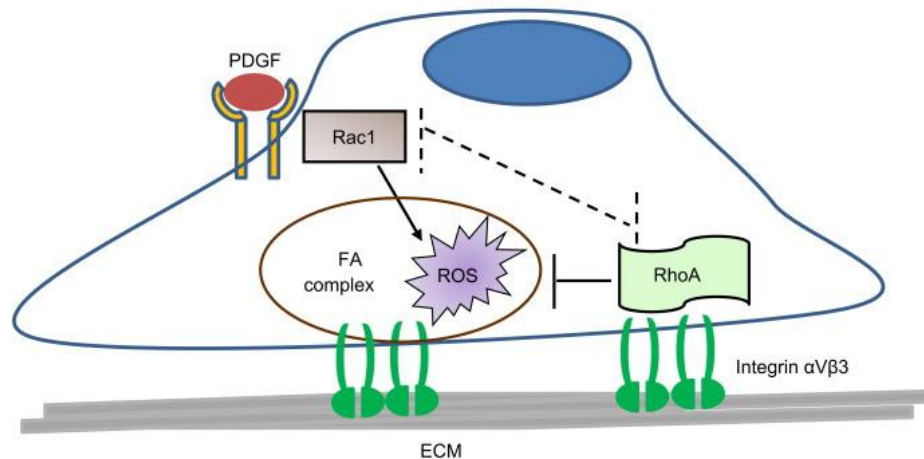


FIGURE 46 : RHOA LIMITE LA PRODUCTION D'ERO AU SEIN DES CONTACTS FOCAUX (L.-J. LIN ET AL. 2013)

De plus, RhoA est impliqué dans la phosphorylation de Nrf2 nécessaire pour l'activation de ce dernier comme vu précédemment (Cho et al. 2007). Or, comme Nrf2 bloque la production des ERO en agissant directement sur la NOX, RhoA permet donc aussi d'inhiber cet autre source oxydante (Cho et al. 2007; Daugaard et al. 2013), contrairement à Rac1 qui produit les ERO au sein de la NOX. Alors que certaines équipes montrent que les ERO provoquent bien l'activation de RhoA (Chi et al. 2010; Kondrikov et al. 2011), d'autres mettent en évidence l'inhibition de RhoA en réponse à la production d'ERO induite par Rac1 (Nimnual, Taylor, et Bar-Sagi 2003). Cette inhibition peut s'expliquer par la formation du pont disulfure intramoléculaire, qui provoque l'inactivation de RhoA (Heo et al. 2006). Ce mécanisme est, par exemple, utile dans la dynamique de la membrane plasmique, permettant la migration, induite par Rac1, ou encore l'étalement cellulaire. Une autre explication est proposée par l'équipe d'Heo (Heo 2010). L'activation de Rac1 stimule la libération d' $O_2^{\bullet-}$ à partir de la NOX, qui à son tour inhibe la protéine tyrosine phosphatase de faible masse moléculaire (LMW-PTP). Or, comme la protéine GAP p190Rho est un substrat de cette LMW-PTP, son inactivation entraîne l'accumulation de la forme phosphorylée active du p190Rho-GAP. Cette dernière stimule l'hydrolyse du GTP lié à RhoA, la rendant inactive. Cette inhibition de RhoA permettrait notamment l'étalement cellulaire dépendant des intégrines.

Finalement, les ERO semblent donc jouer un rôle important dans la régulation des GTPases et de tous les processus pouvant en découler, cependant leur signalisation reste encore obscure.

3. 4) SYNTHÈSE

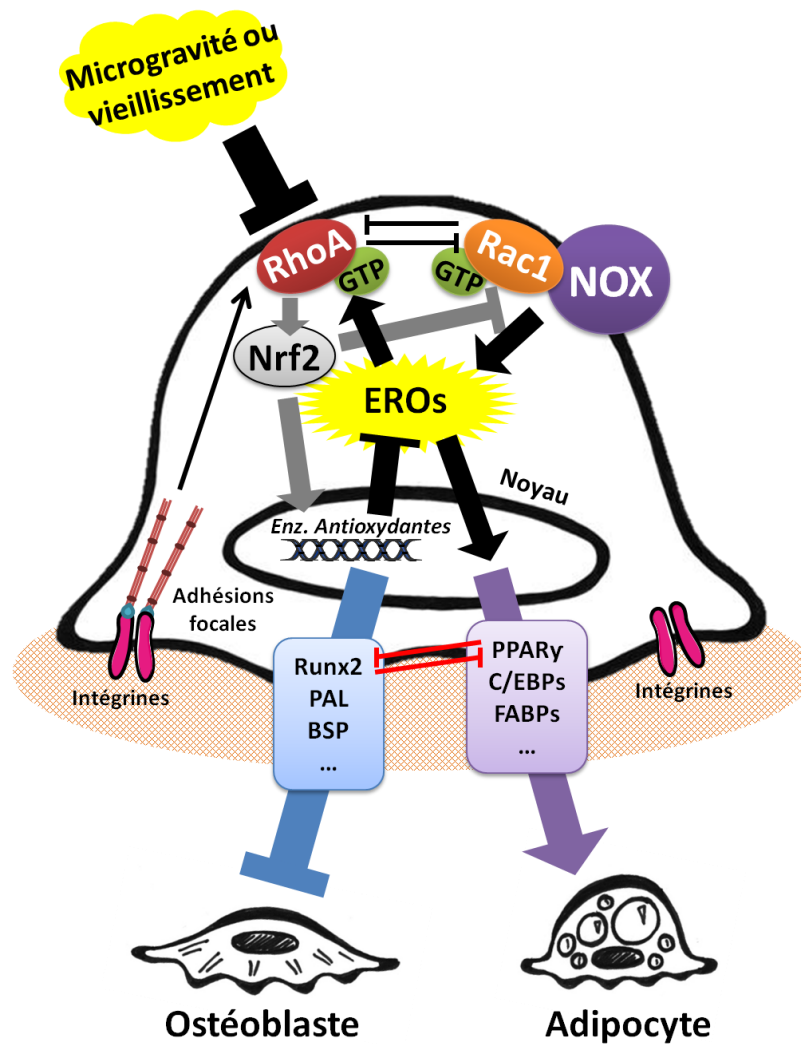


FIGURE 47 : LE STATUT OXYDANT DANS L'ENGAGEMENT DES CSS

Inévitable à tout système aérobie continuellement soumis à des pressions oxydatives, le stress oxydatif, dû au vieillissement ou encore aux radiations cosmiques, induit la production de radicaux libres de l'oxygène qui augmentent l'adipogenèse et ont un effet négatif sur l'ostéogenèse. Ce stress oxydant, observé lorsque la production des espèces oxygénées réactives dépasse les capacités de défense des tissus, entraîne des altérations des composants cellulaires, des protéines, des acides nucléiques cellulaires ou encore de certains cofacteurs enzymatiques.

Or, toute cellule génère des ERO en conditions basales. Si une faible concentration d'ERO induit la prolifération, une concentration plutôt moyenne va permettre le passage en différenciation.

Chez les ostéoblastes, qui ont besoin de beaucoup d'énergie pour sécréter leur matrice extracellulaire et minéraliser les tissus, et donc une forte activité mitochondriale, une protection antioxydante efficace leur est donc nécessaire pour survivre. Les adipocytes montrent au contraire une forte augmentation de leur niveau d'ERO au cours de leur différenciation, ce qui suggère une protection antioxydante moins conséquente que pour les ostéoblastes.

Les RhoGTPases interviennent dans la régulation des ERO en générant une multitude d'intermédiaires réactifs de l'oxygène, comme Rac1 nécessaire à l'activation du complexe NOX. En réponse, les ERO

peuvent d'une part activer la libération du GDP au sein des GTPases et moduler leur activité ; et d'autre part, empêcher la liaison du GTP et provoquer l'inactivation de RhoA (Figure 47).

Cependant, ces régulations sont plus complexes, avec de nombreuses boucles croisées, l'activation de Rac1 pouvant provoquer l'inactivation de RhoA, et la voie RhoA/ROCK pouvant inactiver la NOX par dégradation de son Rac1. Ainsi, les ERO ont été montrés agissant comme second messenger lors de nombreux processus. Notamment, les intégrines des adhésions focales sont aussi modulées par les ERO, et il peut y avoir une production d'ERO à ce niveau, en passant par l'activation de Rac1, régulée par RhoA. Les ERO des contacts focaux peuvent être d'importants modulateurs du turnover de ces structures, ajoutant ainsi d'autres sources d'ERO pouvant moduler la différenciation cellulaire des CSS.

Il pourrait donc exister un lien physique fort entre GTPases, ERO et mécanotransduction puis différenciation, sachant que les réponses cellulaires varient en fonction de la nature chimique, du niveau de production ou site producteur d'ERO.

C. LE STRONTIUM COMME CONTRE-MESURE DES EFFETS DE L'IMPESANTEUR

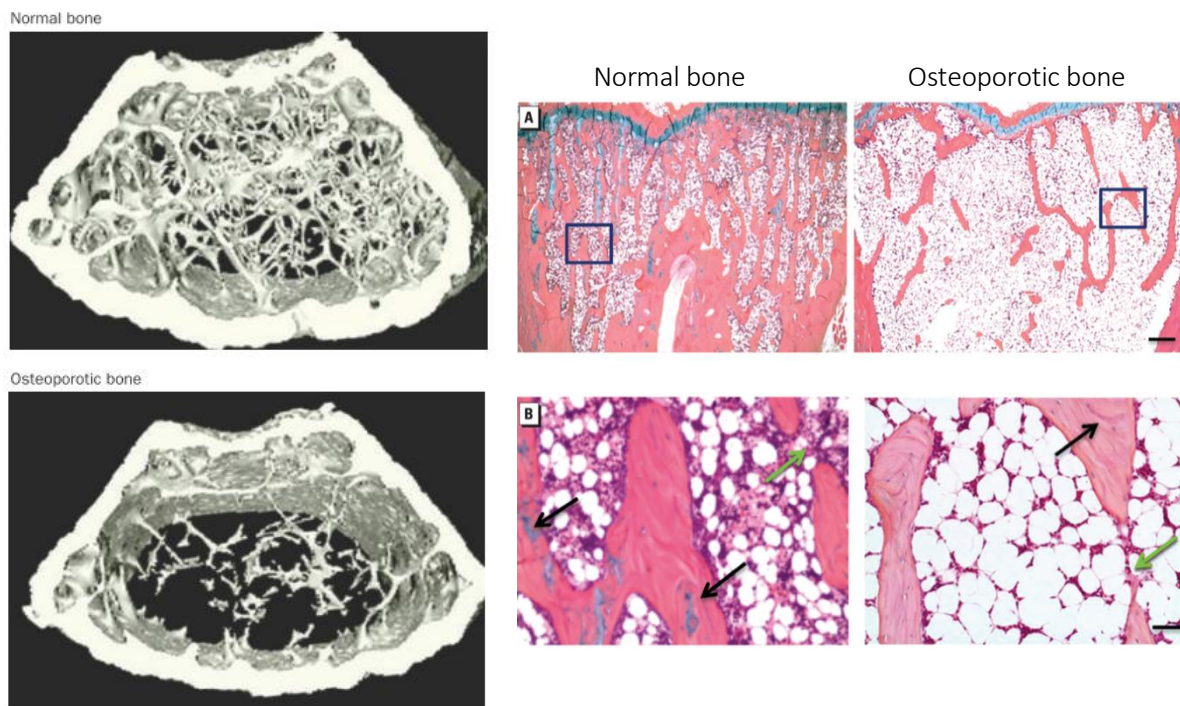


FIGURE 48 : COMPARAISON OS SAIN / OS OSTÉOPOROTIQUE

L'ostéoporose est caractérisée par une perte osseuse, particulièrement au niveau trabéculaire (à gauche). Observation de tissu adipeux d'os trabéculaires (à droite). D'après (Takada, Kouzmenko, et Kato 2009; Beier et al. 2013)

Nous avons vu que l'os est en permanence soumis à un processus de renouvellement et de réparation afin de retirer l'os ancien et endommagé pour le remplacer par un nouvel os sain. Ce remodelage est essentiel à sa solidité. Normalement équilibré et régulé par de nombreuses hormones, il devient moins efficace au cours du vieillissement. L'ostéoporose correspond à cette accélération pathologique du remodelage et conduit à une perte excessive de la masse osseuse et de la résistance de l'os, chez la femme, mais aussi chez l'homme (Figure 48 - gauche). C'est une maladie silencieuse définie donc par une faible masse osseuse et des détériorations microarchitecturales rendant le tissu osseux fragile et potentialisant le risque de fracture. De plus, une augmentation du tissu adipeux médullaire est observée, envahissant l'os trabéculaire (Figure 48 – droite (Beier et al. 2013 ; P. Meunier et al. 1971)), en parallèle à la diminution du volume osseux (Sheu et Cauley 2011).

Un processus similaire à l'ostéoporose est observé chez les astronautes lors des vols spatiaux. L'organisme soumis à l'impesanteur manifeste une perte continue et progressive de calcium et d'os (Vico et al. 2000). Cette perte osseuse a été montrée, à la fois chez l'homme et chez l'animal, et ce dès une semaine en impesanteur (Nicogossian, Huntoon, et Pool 1989). C'est actuellement l'un des risques sanitaires les plus importants des vols spatiaux de longue durée. Comment se caractérise-t-elle ? Et quelles sont les différences avec l'ostéoporose terrestre ?

C. 1. PERTES OSSEUSES SUR TERRE ET DANS L'ESPACE

1. 1) L'OSTÉOPOROSE SUR TERRE

En gravité normale, l'ostéoporose apparaît le plus souvent chez les personnes âgées, entraînant une masse osseuse plus faible due à une plus forte perte osseuse. Cette dernière est impactée par la ménopause chez les femmes, par des prédispositions héréditaires, mais aussi par des facteurs exogènes tels que l'alcool, le tabac, la malnutrition, l'inactivité, ou encore certaines maladies comme les désordres rénaux ou endocrinologiques. Toutes ces causes entraînent un dérèglement de l'équilibre entre formation et résorption de l'os. Ce dérèglement touche à la fois les ostéoblastes et les ostéoclastes (Weiner, Parazynski, et Tasciotti 2012).

Actuellement, avec l'allongement de l'espérance de vie, l'ostéoporose et ses fractures associées représentent un véritable problème de santé publique. On estime qu'aujourd'hui 40 % des femmes autour de 65 ans souffrent d'ostéoporose, 70 % des femmes âgées de 80 ans et plus sont atteintes, et 15% des hommes de plus de 50 ans (*société française de rhumatologie*).

Cette maladie augmente considérablement le risque de fractures. Ainsi, ce ne sont pas moins de 60 000 fractures douloureuses des vertèbres (anciennement appelés tassements vertébraux), 50 000 fractures de l'extrémité supérieure du fémur (les fractures dites du "col du fémur") et 35 000 fractures du poignet dues à l'ostéoporose qui sont à déplorer chaque année en France (*société française de rhumatologie*). Ces fractures compromettent souvent la qualité de vie des patients, en raison des douleurs persistantes qu'elles peuvent engendrer. Plus grave, elles sont susceptibles d'engager le pronostic vital des patients les plus âgés ou fragiles, pouvant aller jusqu'à être la cause de morbidité ou de potentielle mortalité (Center et al. 1999).

Les causes de l'ostéoporose ne sont pas encore toutes élucidées. C'est une maladie multifactorielle qui en plus revêt différentes formes (primaire ou secondaire).

1. 2) LA PERTE OSSEUSE LIEE A L'IMPESANTEUR

En impesanteur, la valeur pondérale du corps et des membres s'annulant, les contraintes mécaniques exercées sur le squelette sont minimales. Le simple maintien d'une position statique n'exige plus qu'une faible contraction des muscles antagonistes, entraînant leur atrophie. La fonction de support mécanique des os disparaît donc quasi complètement. L'ostéoporose en impesanteur est induite par des changements cellulaires (Voir Revue p.93) en parallèle d'un environnement avec des forces mécaniques quasi inexistantes.

L'immobilisation est souvent utilisée chez l'homme pour mimer les conditions d'impesanteur. Cependant, l'équilibre « poids du corps/réponse de l'os » diffère entre des patients immobilisés et des hommes réellement en impesanteur. Alors que des patients immobilisés montrent une ostéoporose avec environ 3% de masse osseuse perdue en trois mois, cette dernière a tendance à se stabiliser ensuite et même à réaugmenter. Au contraire, en impesanteur la perte osseuse engendrée est 4 fois supérieure, ne se stabilise pas et est peu réversible. Ainsi, un voyage d'un an jusqu'à Mars est estimé à une potentielle réduction de plus de 25% de la masse osseuse ! Et ceci pour un astronaute homme, ayant des niveaux les plus favorables d'âge et de masse osseuse, sans facteurs exogènes (tabac, alcool etc...) ou pathologiques, et avec une bonne condition physique (Weiner, Parazynski, et Tasciotti 2012).

Ainsi, la combinaison entre fonctions cellulaires et réponses osseuses altérées, observée en impesanteur, se distingue de l'ostéoporose telle qu'elle est connue sur Terre, avec notamment des astronautes montrant rapidement une forte perte osseuse. De même, les marqueurs systémiques de la résorption osseuse sont considérablement augmentés, tandis que les marqueurs de la formation osseuse sont diminués, jusqu'à des niveaux rarement vus dans des conditions terrestres. La problématique actuelle est surtout que ces changements sont dans certains cas irréversibles lors du retour en condition de gravité «normale».

La grande différence finalement entre l'ostéoporose terrestre et celle liée à l'impesanteur est que la première est une maladie généralisée de l'os, ou systémique, tandis que la seconde reste localisée.

Concrètement, les missions Apollo 14 à 16 ont montré une perte osseuse de près de 2%, alors que ces vols avaient duré seulement 9 à 12 jours (Vogel 1975). Cependant, les astronautes avaient passé la majorité de leur temps sanglés dans une petite capsule et étaient relativement immobiles. En comparaison, dans la première mission Skylab (Skylab 2) de 28 jours, l'équipage avait une forte activité physique ce qui n'a entraîné aucune perte osseuse significative (Vogel 1975). Toutefois, lorsque ces missions sont passées à 2 et 3 mois, une perte osseuse importante a pu être observée (Vogel 1975). Ceci met en évidence l'importance de la durée du vol comme facteur de la perte osseuse. De plus, les commandants des missions montraient à chaque fois peu ou pas de changement dans leur densité osseuse, venant probablement des exercices réalisés, plus ardues, et nécessaires à leurs fonctions. La cause sous-jacente de la perte osseuse serait donc surtout la perte de contraintes mécaniques en impesanteur en plus de la durée de ces contraintes altérées.

Plus précisément, notre laboratoire (Vico et al. 2000) a rapporté une perte allant jusqu'à 24% de l'os trabéculaire distal du tibia chez les cosmonautes après six mois de vol spatial (Figure 49). Six mois après, de nombreux cosmonautes n'avaient pas rétabli complètement leur densité minérale osseuse (BMD). Lang et al. (T. F. Lang et al. 2006; T. Lang et al. 2004) ont aussi montré que sur un vol de 4 à 6 mois, une perte de BMD de 0,9%/mois au niveau de la colonne vertébrale et de 1,4-1,5%/mois au niveau des hanches.

En résumé, ces résultats montrent que les spatonautes subissent une perte substantielle et significative d'os à la fois trabéculaire et cortical, surtout au niveau des hanches, et un peu moins au niveau de la colonne vertébrale (T. F. Lang et al. 2006; T. Lang et al. 2004). Les études en aval indiquent que la reprise de la densité osseuse après des missions spatiales de longue durée peut aller jusqu'à excéder 1 an (Sibonga et al. 2007). De plus, cette perte osseuse s'effectue même lorsque 2 heures d'exercices quotidiens sont réalisées par l'équipage.

Ceci suggère que la perte osseuse induite en impesanteur relève de mécanismes cellulaires sous-jacents causant ce syndrome d'« ostéoporose du cosmonaute » (Voir Revue p.93). Ces mécanismes altérés ont été mis en évidence dans plusieurs types de cellules en impesanteur simulé ou en vols spatiaux.

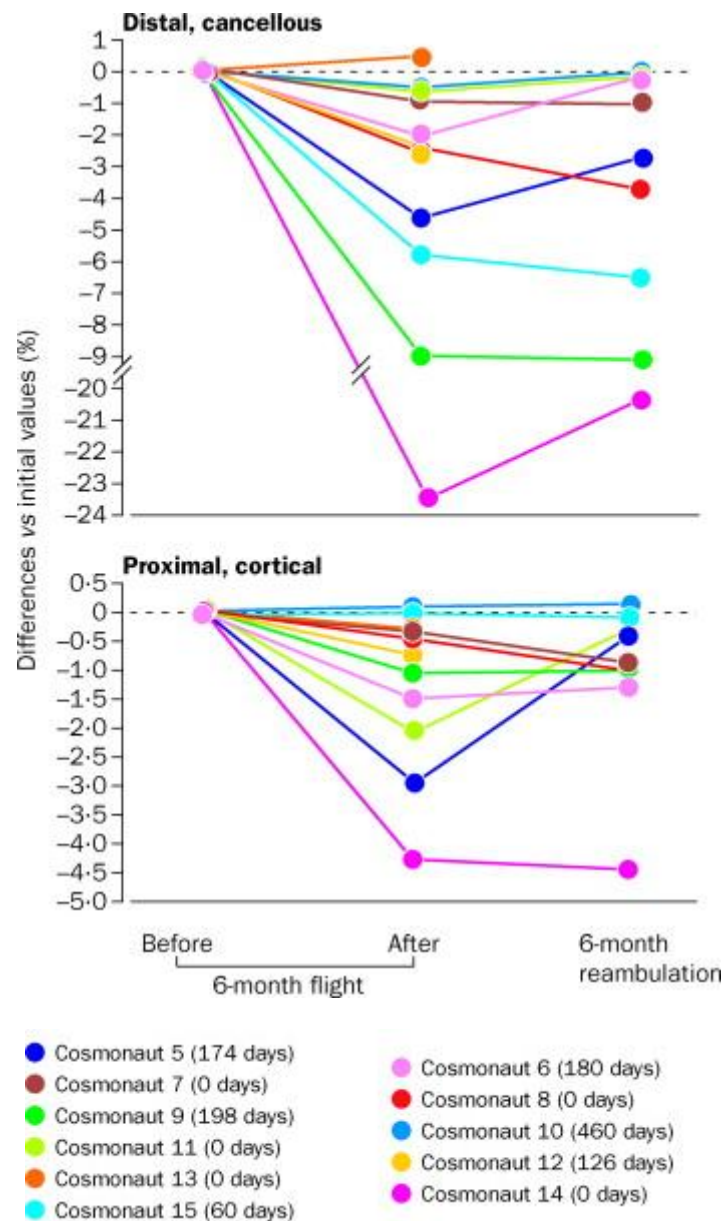


FIGURE 49 : PERTE OSSEUSE CORTICALE ET TRABÉCULAIRE CHEZ 11 SPATIONAUTES APRES DIFFERENTS TEMPS DE VOL (VICO ET AL. 2000)

1. 3) TRAITEMENTS ET PREVENTION DES RISQUES

L'arsenal thérapeutique de l'ostéoporose s'est étoffé ces dernières années et de nombreux types de traitements existent, permettant de limiter la perte osseuse, sans pour autant restaurer les os des patients ostéoporotiques sévères.

3) A) LES TRAITEMENTS "CURATIFS"

Les médicaments les plus utilisés contre l'ostéoporose sont ceux de la classe des bisphosphonates. Ces molécules freinent l'activité des ostéoclastes et limitent donc la perte osseuse.

Ainsi, les bisphosphonates (clodronate, alendronate, risédronate, et ibandronate) diminuent l'incidence de fractures vertébrales, jusqu'à environ 50%, et l'alendronate et le risédronate diminuent l'incidence de fractures non vertébrales de 50% et 35-40%, respectivement (Cranney, Wells, et al.

2002; Cranney, Tugwell, et al. 2002). Ces traitements doivent être suivis pendant un minimum de 4 ans.

D'autres traitements sont apparus ensuite, comme la parathormone, en injection quotidienne, réservé aux formes sévères des vertèbres ou le ranélate de strontium, qui réduit le risque de fractures vertébrales ou de la hanche (Lippuner 2003).

3) B) LES TRAITEMENTS PREVENTIFS

A l'âge adulte, des compléments alimentaires en calcium associée à la vitamine D chez les personnes carencées, ou encore en calcitonine et en oestrogènes, aident à renforcer les os, mais ne constituent pas un traitement suffisant contre une ostéoporose avérée. Une activité physique contribue également à ralentir la perte de densité osseuse. Enfin, le tabagisme et l'alcoolisme doivent être évités car ils diminuent la BMD.

3) C) LA SANTE DES OS DANS LES VOLS HABITES

Dès les premiers vols habités, les physiologistes et les médecins de la NASA ont reconnu l'importance de l'exercice physique pour maintenir la santé musculo-squelettique et cardiovasculaire des astronautes. L'équipement nécessaire à ces exercices physiques en vol est ainsi devenu une exigence pour toutes les missions spatiales de longue durée. Une série de dispositifs, incluant tapis roulants, bicyclettes stationnaires, aviron ergomètre, systèmes d'exercices résistifs ou machines de poids configurables ont évolué au cours des années. Ces appareils d'exercices sont conçus de façon à maintenir la santé cardiovasculaire et cardiopulmonaire en l'absence de gravité.

Le record du monde de durée dans l'espace est détenu pour l'instant par le Dr Valeri Polyakov, qui a passé 437 jours consécutifs en impesanteur, atterrissant en 1995. Durant cette mission d'endurance, il a dû réaliser jusqu'à quatre heures d'exercices par jour, ce qui a permis de limiter sa perte osseuse (Cosmonaute n°10 Figure 49). Cependant, malgré ses effets bénéfiques, passer jusqu'à deux heures chaque jour dans le seul but de faire des exercices physiques reste problématique. De plus, la réadaptation physique de l'équipage après le vol reste à améliorer, ce processus pouvant prendre plusieurs mois, afin de restaurer la densité osseuse des domaines essentiels tels que les hanches et les vertèbres lombaires. De même, la compréhension des processus cellulaires et intracellulaires impliqués dans le maintien de la densité osseuse est nécessaire avant de pouvoir envoyer des hommes pour de longs séjours dans l'espace et de prévoir des expéditions jusqu'à Mars.

C. 2. LE RANELATE DE STRONTIUM CONTRE L'OSTEOPOROSE

Le Strontium (Sr) est l'élément actif du Ranélate de strontium (PROTELOS®, Laboratoires Servier), c'est un analogue structural au Calcium (Ca) et proche de ce dernier dans la classification périodique des éléments. Le Ranélate de strontium est composé de chlorure de strontium et d'acide ranélique.

De nombreux ions métalliques bivalents ont démontré ces dernières années leurs effets bénéfiques lors d'applications en ingénierie tissulaire. Notamment, les Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} et Co^{2+} , jouent un rôle vital à la fois sur l'ostéogénèse et l'angiogénèse, en induisant la calcification, ou en inhibant la résorption osseuse. Le Sr^{2+} a lui été montré comme induisant l'activité et la prolifération des ostéoblastes, tout en limitant le nombre et l'activité des ostéoclastes (Shepherd, Shepherd, et Best 2012).

2. 1) GENERALITES

Le strontium est un élément chimique de symbole Sr et de numéro atomique 38. C'est un métal mou, malléable, gris. Il est naturellement présent sous forme de traces au sein des tissus osseux (0,035% de la teneur en calcium de notre squelette). Le strontium se trouve à l'état naturel dans des minerais tels que la célestine $SrSO_4$ et le strontianite $SrCO_3$ (Figure 50), mais le taux de strontium présent dans la croûte terrestre est faible (0,034%).

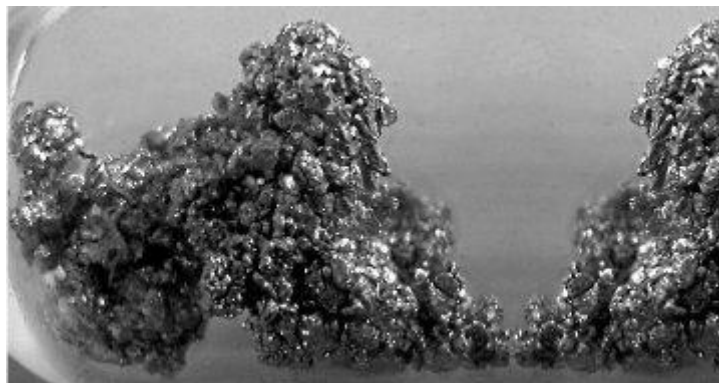


FIGURE 50 : LE STRONTIUM A L'ETAT NATUREL

Dans le tissu osseux que ce soit chez l'animal ou chez l'Homme, le strontium est principalement adsorbé à la surface des cristaux d'apatite de l'os et ne se substitue que faiblement au calcium dans ces cristaux nouvellement formé (AFSSAPS, 2010). Dans l'alimentation ou en tant que médicament, le strontium est absorbé au niveau du tube digestif par les mêmes mécanismes que le calcium, mais l'absorption de ce dernier reste préférentielle. Le strontium se retrouve dans l'organisme sous forme de traces : son absorption par l'alimentation représente 1,9 mg/j, les sources d'apport naturel du strontium étant essentiellement l'eau et les végétaux (MARCUS et LENGEMANN 1962). Ensuite, la part non éliminée de strontium ingéré ou inhalé se retrouve à 99 % concentrée dans le système osseux et le tissu conjonctif, et se fixe aussi au niveau des dents ou des cheveux (Pors Nielsen 2004). Le Strontium est un élément essentiel : son absence totale peut provoquer la mort (Bonnevier et al. 2002).

Sachant qu'une supplémentation en calcium peut aider à renforcer les os, quel peut être l'intérêt du strontium en tant qu'analogie, par rapport au calcium ?

Les suppléments de calcium sont en fait actuellement au centre d'une controverse. En effet, une augmentation de l'incidence des événements vasculaires cardiaques et cérébraux a été observé chez des femmes âgées, en bonne santé, quand elles recevaient des suppléments de calcium (Bolland et al. 2010). En fonction des différentes études effectuées, les effets néfastes cardiovasculaires s'observent en fait surtout chez les sujets avec des apports spontanés déjà élevés en calcium (B. U. et R. Rizzoli 2011).

Comme le strontium, après absorption chez les patients, s'accumule plutôt en très grande majorité dans les os, il apparaît potentiellement moins nocif pour l'ensemble du corps que le calcium, ce qui renforce l'intérêt de son utilisation.

2. 2) EFFETS *IN VIVO* DU STRONTIUM, ACTIONS BENEFIQUES ET EFFETS SECONDAIRES INDESIRABLES

2) A) EFFETS BENEFIQUES SUR L'OS

En 2004, l'équipe de Meunier montrait les effets positifs du Ranélate de Strontium comme médicament anti-ostéoporotique (P. J. Meunier et al. 2004). Le nombre de nouvelles fractures vertébrales était réduit de 49 % dans le groupe ranélate de strontium durant la première année et de 41 % au cours de la période d'étude. La densité minérale osseuse était augmentée au terme de l'étude, de 14,4 % pour le rachis lombaire et de 8,3 % pour le col du fémur. La fréquence des effets indésirables graves étant comparable dans les 2 groupes, il est conclu que le ranélate de strontium semble être un traitement sûr et efficace de l'ostéoporose post-ménopausique, capable d'entraîner une réduction rapide et durable du risque de fracture vertébrale.

2) B) UNE SURESTIMATION OU DE REELS EFFETS BENEFIQUES ?

Depuis, les effets bénéfiques du strontium ont été plusieurs fois mis en évidence et ne laissent aucun doute quant à sa double action sur la formation et la résorption osseuse *in vivo*. L'équipe de Stepan ont cherché à aller plus loin dans ces données (Stepan 2013). Le strontium se substitue au calcium au sein de la maille d'hydroxyapatite des minéraux de l'os. Or, lorsque la masse osseuse est mesurée par BMD (densité minérale osseuse), les atomes de strontium présents dans l'os atténuent plus fortement les rayons X que les atomes de calcium, étant plus denses car ayant le double du nombre atomique. Ceci est souvent interprété comme une hausse du contenu calcique osseux, induisant une augmentation artificielle de la mesure de la BMD (Blake et Fogelman 2005). Plus précisément, 1% de fraction molaire de strontium cause une surestimation de 10% de la BMD (Nielsen et al. 1999). Comme l'adsorption du strontium se réalise de façon hétérogène au niveau des os, se retrouvant plutôt dans l'os néoformé (Bärenholdt, Kolthoff, et Nielsen 2009), appliquer des facteurs de corrections aux mesures de la BMD reste difficile. Ainsi actuellement, les niveaux de strontium sont mesurés à des sites précis, après ajustement en utilisant l'absorptiométrie photonique spécifique. Les résultats montrent toujours une augmentation du strontium et des valeurs de BMD pour l'ensemble des huit années de traitement.

De plus, la qualité des cristaux de minéraux dans les os peut affecter la résistance mécanique de l'os, car la cristallinité de l'apatite détermine précisément son module d'élasticité, la résistance à la fatigue, et le risque de fracture (Gourion-Arsiquaud et al. 2013). Et justement, l'hétérogénéité de la distribution osseuse du strontium semble augmenter les paramètres biomécaniques de façon dose-dépendante chez les femmes ménopausées ostéoporotiques traitées pendant 2 ans (R. Rizzoli et al.

2012). D'autres études sont cependant nécessaires pour examiner si l'efficacité antifracturaire du strontium est liée à ce changement dans la composition et dans la cristallinité de l'os.

Ces différents éléments sur l'adsorption du strontium ou la qualité des cristaux d'apatite de l'os peuvent, au moins en partie, expliquer les effets bénéfiques du strontium sur la réduction du risque de fractures, mais le mécanisme de ces effets nécessite toujours des études complémentaires pour mieux comprendre ses signalisations intracellulaires.

C. 3. LES MECANISMES CELLULAIRES ACTUELLEMENT CONNUS DU STRONTIUM

Une des conditions pour une bonne prise de décision à propos d'un traitement approprié pour un patient, est la connaissance du mécanisme d'action du médicament. Ce n'est pas seulement une question d'efficacité, mais aussi de sécurité à long terme. La connaissance de ce mécanisme d'action peut aussi permettre la recherche d'autres thérapies efficaces. C'est le cas du ranélate de strontium.

Après avoir été amplement utilisé dans les années 50 pour la prise en charge de l'ostéoporose, un regain d'intérêt à l'égard de cet élément s'est manifesté à partir des années 2000 sous forme d'une nouvelle molécule, le ranélate de strontium (Letonturier 2004). Cependant, même actuellement le mécanisme précis de l'action du strontium n'est pas encore complètement élucidé. Néanmoins, de nombreuses pistes ont été publiées ces dernières années.

3. 1) UN INHIBITEUR DE L'OSTEOCLASTOGENESE

L'action du strontium sur l'ostéoclastogénèse a été plusieurs fois mise en évidence, montrant l'inhibition de la différenciation des ostéoclastes, de leur activité et aussi de la résorption osseuse (Takahashi et al. 2003). Des études plus récentes posent quelques explications sur l'action moléculaire permettant cette inhibition, en établissant que le strontium réduit les capacités d'adhérence des ostéoclastes aux os, en altérant l'actine de la zone de scellement lors du remodelage osseux (Bonnelye et al. 2008). Il joue aussi sur la voie NF- κ B (Facteur nucléaire kappa-B) (Caudrillier et al. 2010) pour inhiber l'ostéoclastogénèse, ainsi que sur le nombre et l'activité des ostéoclastes (Bonnelye et al. 2008). De plus, en cas de haut dosage, il induit l'apoptose des ostéoclastes par la voie PKC β II (Hurtel-Lemaire et al. 2009). Les doses permettant de jouer sur la différenciation et la survie des ostéoclastes lors de ces expériences sont similaires à celles retrouvées adsorbées à la surface des os traités au strontium (Dahl et al. 2001), et prouvent ainsi l'effet anti-résorbant de ce dernier.

3. 2) UN ACTIVATEUR DE L'OSTEOGENESE

La particularité du strontium, c'est d'agir à la fois sur les cellules de la résorption, et sur les cellules de la formation osseuse. Ainsi, il a été montré comme inducteur de la réplication des préostéoblastes et de la fonction des ostéoblastes matures, augmentant la synthèse de la matrice osseuse (Sila-Asna et al. 2007). Il induit aussi la différenciation des ostéoblastes, comme en témoignent l'activation de la phosphatase alcaline, et de la synthèse de collagène. Le strontium induit aussi la sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéocalcine (OCN) (Bonnelye et al. 2008). Ces éléments montrent le caractère ostéoinducteur du strontium, certains pensent même que les ostéoblastes traités par le strontium sont poussés dans leur différenciation vers un phénotype ostéocytaire (Atkins et al. 2009).

En effet, Atkins et coll. ont étudié l'impact du strontium sur la différenciation ostéocytaire des ostéoblastes (Atkins et al. 2009). En fonction de la dose et du temps de traitement utilisé, celui-ci induit significativement un phénotype ostéocytaire chez des ostéoblastes, dès 5mM (et jusqu'à 25mM), en augmentant la minéralisation, l'expression de STRO-1 (Phycoérythrine), DMP-1 et la sclérostine, ainsi que le ratio OPG/RANKL, après 25 jours de différenciation.

De plus, des ostéocytes traités avec 3mM de strontium et stimulés mécaniquement, induisent leurs sécrétions de NO et de PGE2, ce qui en co-culture avec des ostéoclastes, va encore plus inhiber leur différenciation, et suractiver l'ostéoblastogénèse s'il y a co-culture avec des ostéoblastes. Le strontium module la signalisation entre les ostéocytes stimulés mécaniquement et les précurseurs ostéogéniques et ostéoclastiques (Bakker, Zandieh-Doulabi, et Klein-Nulend 2013). Et finalement, des ostéocytes traités jusqu'à 5mM de strontium montrent une induction de leur expression en récepteur sensible au calcium, de façon dose-dépendante (Aveline et al. 2013).

Ces résultats peuvent renforcer les explications sur les effets bénéfiques du strontium sur le squelette, en induisant aussi l'action des ostéocytes.

3. 3) UN LIMITATEUR DE L'ADIPOGENESE

Les ostéoblastes et les adipocytes, comme vu précédemment, dérivent des mêmes cellules souches mésenchymateuses situées dans la moelle osseuse des os. Le strontium agit sur l'engagement et la différenciation de ces cellules, activant l'ostéoblastogénèse (cf. paragraphe précédent), et inhibant l'adipogénèse comme en témoignent l'inhibition des gènes caractéristiques de la différenciation adipogénique : PPAR γ , C/EBP α et LPL (Lipoprotéine lipase) (Fournier et al. 2012; Vidal et al. 2012; Saidak et al. 2012). Chez des souris sénescences, l'action inhibitrice de l'adipogénèse tiendrait à l'activation des voies NFATc (Facteur nucléaire des lymphocytes T activés cytoplasmique)/Maf (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog) et Wnt (Saidak et al. 2012). Le strontium contrôle aussi l'engagement des cellules par le biais de l'activation de la voie ERK (Extracellular signal-regulated kinases)-MAPK, ce qui induit la formation osseuse, réduit l'adipogénèse et augmente ainsi la masse osseuse (Fournier et al. 2012).

3. 4) LES RECEPTEURS DU STRONTIUM

L'une des cibles les plus importantes du strontium est le récepteur extracellulaire sensible au calcium (CaSR). C'est un récepteur transmembranaire couplé à une protéine G, qui permet de détecter la concentration en calcium extracellulaire. Il joue un rôle dans le maintien de la calcémie, modulant la réabsorption du calcium au niveau des reins ainsi que l'inhibition de la sécrétion de PTH régulée par le calcium (Brown et MacLeod 2001). Le CaSR est exprimé dans toutes les cellules de la lignée ostéogénique (Dvorak et Riccardi 2004), ainsi que dans les ostéoclastes et leurs précurseurs (W Chang et al. 1999).

L'importance du CaSR dans la régulation dans cellules osseuses a été établie à partir d'études biochimiques et génétiques. Dans de nombreuses espèces, il induit la chimiotaxie et la prolifération des ostéoblastes (Z. Huang, Cheng, et Slatopolsky 2001). Il est aussi impliqué dans la différenciation des ostéoblastes, de forts taux en calcium augmentant les marqueurs de différenciation ostéogéniques en culture cellulaire (González-Vázquez, Planell, et Engel 2014), et l'inhibition des fonctions de ce récepteur diminuant l'expression des gènes spécifiques ostéogéniques. Ainsi, de

nombreuses études montrent que cette concentration en calcium extracellulaire peut contrôler la prolifération et la différenciation des cellules osseuses à travers l'activation du CaSR (Wenhan Chang et Shoback 2004).

Cette activation contrôle plusieurs signalisations en cascades, incluant celles dépendantes de la phospholipase C (PLC), de la protéine kinase C (PKC), des kinases ERK1/2, des kinases Jun et des protéines kinases A dépendantes de l'AMPc (Figure 51). Notamment, l'augmentation de la prolifération des cellules ostéogéniques par le CaSR est permise par l'activation de la voie ERK1/2. De plus, le CaSR induit la voie de signalisation Akt qui permet la survie des ostéoblastes, dépendante du calcium (Saidak et Marie 2012).

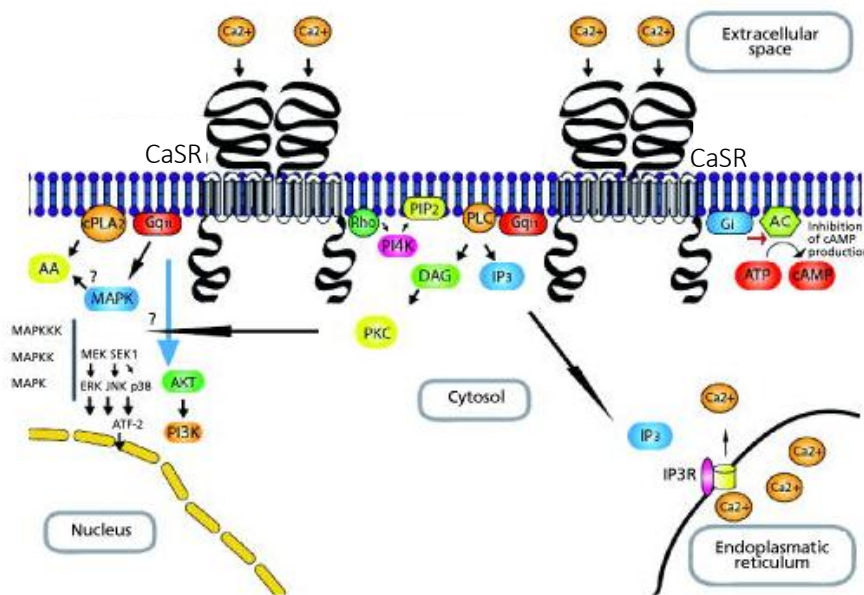


FIGURE 51 : LES VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES PAR LE RECEPTEUR SENSIBLE AU CALCIUM

AA : acide arachidonique, AC : adénylate cyclase, AKT : protéine kinase B, ATF-2 : facteur de transcription activateur 2, Gi et Gq : protéines G hétérotrimériques, IP₃ : inositol-1,4,5-triphosphate, PI4K : kinase 4-phosphatidylinositol, PI3K : kinase 3-phosphatidylinositol, PIP₂ : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate, SEK1 : protéine kinase ERK 1 activée par le stress. (Tfelt-Hansen 2008)

En tant qu'agoniste du calcium, le strontium peut se lier et activer le CaSR, malgré une plus faible affinité. Il active ainsi les voies PLC ou ERK1/2. Le strontium peut aussi moduler les niveaux intracellulaires de calcium via les récepteurs inositol triphosphate (InsP3) et l'activité PLC (Coulombe et al. 2004). L'induction de la prolifération des ostéoblastes traités au strontium est réalisée par l'activation des voies PKC, PKD ou MAP kinases p38 (Caverzasio 2008). Ainsi, l'action du strontium sur le CaSR permet de contrôler la prolifération, la différenciation et la survie des cellules ostéogéniques.

Cependant, les effets du strontium ne dépendent pas uniquement du CaSR. En effet, des souris knock-out pour ce récepteur montrent quand même des inductions de gènes ostéogéniques quand elles sont traitées au strontium (Pi et Quarles 2004), et leurs ostéoblastes en culture ont aussi une augmentation de leur prolifération (Fromigué et al. 2009). Un autre récepteur, similaire au CaSR, le GPRC6 (Récepteur couplé à une protéine G de la famille C groupe 6 membre A) est sensible aux cations bivalents extracellulaires. C'est aussi un récepteur de l'ostéocalcine. Il est exprimé chez les ostéoblastes et son activation a été mise en évidence lors d'un traitement au strontium, entraînant la

voie ERK1/2 (Pi et al. 2010). De même, des souris knock-out pour ce récepteur ont un défaut de réponse au calcium (Pi et al. 2010), renforçant l'importance de ce dernier dans les effets du strontium.

Le strontium peut aussi pénétrer directement à l'intérieur des cellules grâce aux canaux calciques. Par exemple, le canal de type L (Long) est perméable aux ions calcium, baryum et strontium. L'équipe de a ainsi montré que le strontium peut activer l'ostéoblastogénèse grâce à ces canaux calciques, qui induisent ensuite la voie des MAPK et l'activation de la β -caténine (Fernández et al. 2013).

3. 5) LE STRONTIUM DANS LA SIGNALISATION PAR CYTOKINES ENTRE OSTEOBLASTES-OSTEOCLASTES

Non seulement le strontium agit à la fois sur les cellules jouant sur la formation et la résorption des os, mais il peut aussi réguler les cytokines permettant les signaux entre ces différents types cellulaires. Notamment, les ostéoblastes et leurs précurseurs produisent une cytokine particulière, le RANK-L, reconnu par un récepteur à la surface des cellules (i.e. RANK) et exprimé chez les ostéoclastes et leurs précurseurs. La liaison du RANKL sur son récepteur RANK active une signalisation intracellulaire qui permet la différenciation des ostéoclastes. Les ostéoblastes sécrètent aussi une autre cytokine, l'ostéoprotégérine (OPG), qui lorsqu'elle se fixe sur le récepteur RANK, agit comme un antagoniste, empêchant l'activation de RANK et la différenciation ostéoclastique (Hofbauer, Kühne, et Viereck 2004). Dans des cultures primaires d'ostéoblastes humains, le strontium permet non seulement l'induction de l'expression de l'OPG, mais il diminue aussi la sécrétion de RANKL, inhibant ainsi d'autant plus l'ostéoclastogénèse (Caudrillier et al. 2010). Ces deux effets du strontium proviennent aussi de l'activation du CaSR, permettant comme vu précédemment, d'augmenter la réplication, la fonction et la survie des ostéoblastes, mais aussi le ratio OPG/RANKL, jouant ainsi à la fois sur la résorption et la formation osseuse.

3. 6) LE ROLE DU NFAT ET DE LA VOIE WNT

Un autre mécanisme d'action du strontium a été mis en évidence, impliquant le facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT). Dans les conditions basales, les protéines NFAT sont hautement phosphorylées et restent dans le cytoplasme. Une faible augmentation du calcium intracellulaire entraîne l'activation de la phosphatase cytoplasmique calcineurine (Cn), ayant pour substrats les protéines NFAT. La liaison de ces protéines à Cn entraîne leur déphosphorylation et donc leur translocation au noyau, régulant des gènes cibles spécifiques (Hogan et al. 2003). Or, cette signalisation Cn/NFAT est importante pour la régulation de la formation osseuse, la résorption et donc la masse osseuse. Notamment, elle agit comme inducteur de l'ostéoblastogénèse, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Winslow et al. 2006).

Le strontium induit justement cette voie Cn/NFAT chez les ostéoblastes, mais le mécanisme exact n'est pas encore connu. Une des possibilités est que l'action par le strontium sur le CaSR, active la voie Cn/NFAT en jouant sur la concentration de calcium intracellulaire. Dans tous les cas, cette activation permet la réplication des ostéoblastes et induit les gènes de l'ostéoblastogénèse (Fromigué et al. 2010). En particulier, la voie Wnt y est ainsi activée par le strontium (Wnt3a, Wnt5a et β -caténine). Cette voie joue un rôle déterminant dans le contrôle de la réplication, de la différenciation et de la survie des cellules. Des études ont montré que le strontium active les deux voies canonique et non-

canonique chez les ostéoblastes, induisant ainsi leurs fonctions et leur réplication (Fromigué et al. 2010).

Ainsi, au moins deux mécanismes du strontium, incluant la signalisation Cn/NFAT et les voies Wnt, convergent afin d'activer l'ostéoblastogénèse.

3. 7) EFFET DIRECT DU STRONTIUM SUR LA PHOSPHATASE ALCALINE ET LES MINÉRAUX FORMÉS PAR LES OSTÉOBLASTES

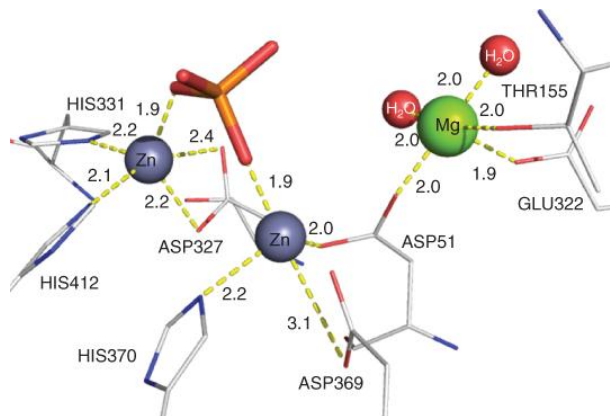


FIGURE 52 : STRUCTURE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE
(Bowman-James, Bianchi, et García-España 2012)

Les ostéoblastes matures expriment fortement la phosphatase alcaline spécifique de l'os, l'enzyme clé de la formation osseuse par minéralisation de l'ostéoïde (Whyte 2010). Ce marqueur de l'ostéoblastogénèse est une métallo-enzyme située à la fois dans leur membrane cellulaire que dans les vésicules matricielles permettant la minéralisation (Golub et Boesze-Battaglia 2007). Son activité catalytique est dépendante des monomères qui la composent. Ainsi, elle a besoin d'un Mg^{2+} et de deux Zn^{2+} pour stabiliser sa structure tertiaire (Figure 52). Comme la PAL

est une exoenzyme avec un domaine présent dans le compartiment extracellulaire, son activité et sa fonction peuvent être régulées par les conditions de son environnement ou par certains traitements thérapeutiques (Fernández et al. 2014).

Le strontium a une structure très proche du calcium, peut donc le substituer au sein de la maille d'hydroxyapatite et ainsi être incorporé dans l'os (Saidak et Marie 2012). Notamment, il a été montré que dans les os néoformés, le strontium se substitue au calcium à un rapport de 1/10 atomes au sein des minéraux (Bärenholdt, Kolthoff, et Nielsen 2009). Ce strontium, incorporé dans les minéraux peut agir directement sur la phosphatase alcaline osseuse exprimée par les ostéoblastes, ou sur celles présentes dans les vésicules de minéralisation, modulant ainsi la formation osseuse. L'équipe de Fernández a ainsi mis en évidence l'effet positif de la substitution du calcium par le strontium au sein de la phosphatase alcaline. De façon dose-dépendante, il permet d'en diminuer son K_m , et ainsi d'augmenter l'affinité pour son substrat. De plus, son effet est décuplé si il est co-incubé avec du Zn^{2+} . Cette étude montre une voie métabolique alternative, indépendante du CaSR contrairement aux paragraphes précédents, et pouvant renforcer la formation osseuse.

Par ailleurs, comme le montre Querido et coll. en recueillant le minéral des ostéoblastes traités en culture, le strontium change aussi la composition des minéraux formés par la phosphatase alcaline, en se substituant à 1/10^{ème} des Ca^{2+} . La maille structurale de l'hydroxyapatite s'en retrouve élargie du fait des molécules de strontium qui sont plus larges, et du changement d'environnement des phosphates (Querido et al. 2014). Ces changements augmentent la solubilité de l'hydroxyapatite, induisant l'activité et la prolifération des ostéoblastes (Shepherd, Shepherd, et Best 2012), et peuvent permettre une meilleure qualité des cristaux d'apatite de l'os, comme vu précédemment.

3. 8) STRONTIUM ET RHOGTPASES

Seulement deux équipes, pour l'instant, ce sont intéressés à la modulation des RhoGTPases par le strontium. Peng et coll. avaient d'abord mis en évidence l'importance de la voie Ras/MAPK dans l'induction de l'ostéogénèse par le strontium, en permettant l'augmentation de Runx2, ERK1/2, p38, la phosphatase alcaline, la BSP et l'OCN chez les CSS (Peng et al. 2009). Puis, Fromigué et coll. ont montré indirectement l'implication de RhoA dans l'ostéogénèse induite par le strontium, en démontrant qu'un blocage de l'activité de ROCK, empêche la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, en inhibant le Col I, Runx2 et la phosphatase alcaline (Fromigué et al. 2010). Mais l'activation directe des RhoGTPases par le strontium reste encore à démontrer.

3. 9) SYNTHÈSE DU FONCTIONNEMENT DU STRONTIUM

Au cours du vieillissement ou en cas d'impesanteur, le processus de remodelage osseux devient moins efficace et conduit à une perte excessive de la masse osseuse. Cette perte osseuse est généralisée dans le cas de l'ostéoporose terrestre et reste localisée mais plus rapide en impesanteur.

Le strontium permet d'une part de limiter la résorption osseuse tout en induisant sa formation. Il a été montré comme induisant l'activité et la prolifération des ostéoblastes et limitant le nombre et l'activité des ostéoclastes. En parallèle il inhibe aussi l'adipogénèse en réprimant PPAR γ et C/EBP α . Son action passe en majorité par le récepteur sensible au calcium (CaSR) qui permet de contrôler la prolifération, la différenciation et la survie des cellules ostéogéniques. Un autre récepteur, peut aussi être impliqué dans son action, c'est le GPRC6 qui induit la voie ERK1/2. De plus, le strontium peut aussi pénétrer directement dans la cellule pour activer notamment la voie des MAPK (Figure 53).

Le strontium permet l'induction de l'OPG et la diminution de la sécrétion de RANKL, inhibant l'ostéoclastogénèse. Son action peut aussi passer par la voie Cn/NFAT qui permet la réplication des ostéoblastes et induit les gènes de l'ostéoblastogénèse et de la voie Wnt. La signalisation résultante active RhoA et recrute la signalisation en cascade de la voie NFAT. Mais l'activation directe des RhoGTPases par le strontium n'a pas encore été démontrée.

Finalement, le strontium peut agir directement sur la phosphatase alcaline, en se substituant au calcium dans ses monomères. Il permet d'induire son affinité pour son substrat et donc son activité. De même, il peut se substituer au niveau de la maille d'hydroxyapatite, pouvant induire une meilleure qualité des cristaux d'apatite de l'os, et ainsi expliquer la diminution des fractures *in vivo*.

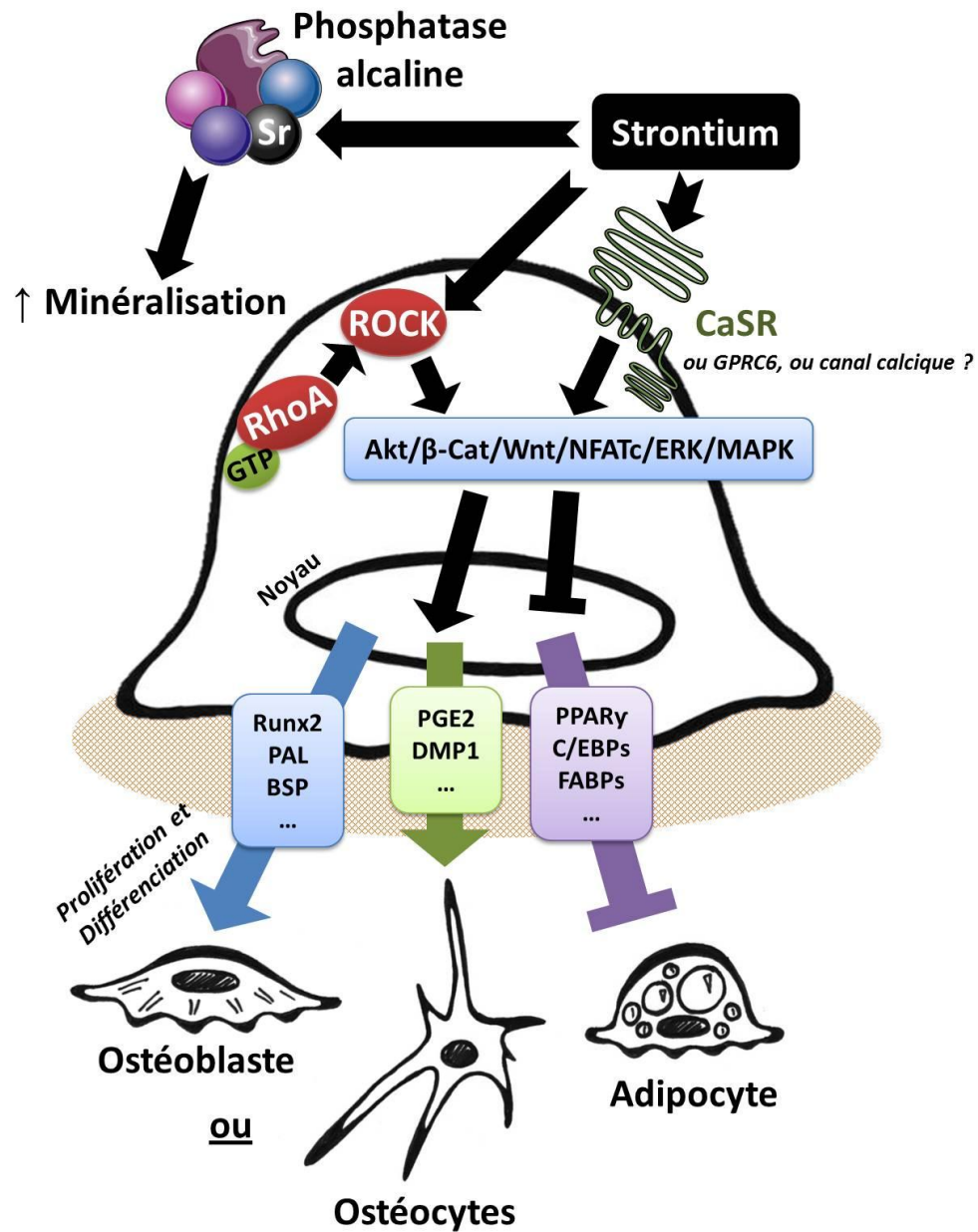
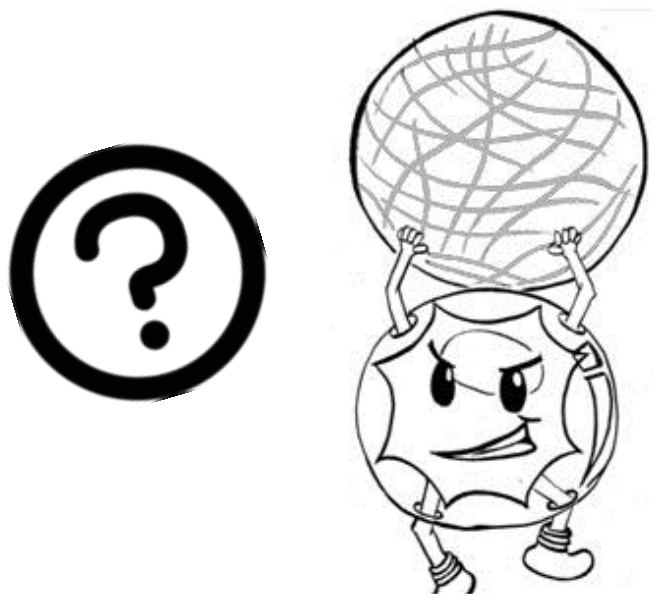


FIGURE 53 : MECANISMES D'ACTION DU STRONTIUM



STRATEGIE DE RECHERCHE

Sachant que les CSS répondent facilement aux changements d'environnement mécanique, elles apparaissent comme de bons modèles pour visualiser l'impact de l'absence de gravité, sur leur différenciation en adipocytes ou en ostéoblastes. Elles sont aussi parfaitement appropriées pour montrer le pouvoir de contre mesure du strontium dans ce contexte.

Nous avons choisi de tester la réactivité de cellules de la lignée C3H10T1/2 pour leur mécanosensibilité, leur multipotence et leur facilité de culture (importante pour des projets spatiaux futurs). Cette étude a demandé l'utilisation de cultures 3D sur billes de plastique recouvertes de collagène, tout d'abord afin de se rapprocher de la réalité physiologique de l'*in vivo*, et ensuite car l'appareil utilisé pour simuler l'impesanteur nécessite l'ensemencement préalable des cellules adhérentes sur un support particulier, permettant sa rotation autour d'un l'axe et limitant les contraintes mécaniques appliquées sur les cellules. Ces billes collagénées nous ont permis d'avoir des supports ostéoinducteurs, par dépôt d'hydroxyapatite à leur surface, activant la différenciation en ostéoblastes de cellules embryonnaires ayant un phénotype et des caractéristiques bien loin des précurseurs ostéogéniques. De plus, l'utilisation d'un bioréacteur 3D horizontal pour mimer les conditions d'impesanteur nous a obligé à définir des conditions de culture 3D ostéogéniques et adipocytaires avant d'envisager des co-cultures.

La première partie des résultats inclut une revue de la littérature sur le constat que l'interprétation des résultats obtenus en impesanteur ou sous contraintes mécaniques peut s'expliquer par la mise en jeu des RhoGTPases. Ces molécules clés peuvent servir de témoin de signalisation et l'étude, au cours de cette thèse, de l'activité spécifique des GTPases actives antagonistes RhoA-GTP et Rac1-GTP permet de simplifier les multiples voies de signalisation que nous ne pouvions pas toutes étudier sur nos cellules multipotentes.

La découverte du rôle clé du statut oxydant à la fois dans la différenciation des cellules souches multipotentes et dans la régulation des GTPases est le fil conducteur de notre premier article qui permet de montrer que le strontium pourrait avoir un effet modulateur du statut oxydant des cellules via une stimulation de RhoA, deux événements qui sont probablement à l'origine de l'inhibition de l'adipogénèse par le strontium.

Le second article, étudie la régulation de l'adipogénèse en 3D ainsi que de l'ostéogénèse sous strontium en montrant qu'il agit par activation des GTPases RhoA et Rac1, liée à la signalisation spécifique des isoformes du VEGF, et notamment le complexe Flt-1/VEGF matriciel.

Des résultats complémentaires à ces articles soumis ou en soumission reviennent sur la nature des adipocytes formés par les C3H10T1/2, apparaissant comme de bons adipocytes médullaires, ainsi que la cinétique particulière des RhoGTPases pendant l'adipogénèse et l'ostéogénèse. Tout ceci révélant le strontium en tant qu'inducteur ostéogénique efficace, dont les applications fondamentales amènent de nouvelles voies d'utilisation.



MATERIEL ET METHODES

Les C3H10T1/2	87
Les doses de strontium utilisées	87
Le Rotating Wall Vessel	88
La Minéralisation des billes et son action ostéoinductive	89

LES C3H10T1/2

La lignée cellulaire C3H10T1/2 a été créée en 1973 à partir d'embryons de souris C3H âgés de 14 à 17 jours. C'est une lignée de fibroblastes embryonnaires de type p53 sauvage (Coleman, Grisham, et Smith 1994; Reznikoff, Brankow, et Heidelberg 1973). Ces cellules présentent une morphologie fibroblastique en culture cellulaire et sont fonctionnellement similaires aux cellules souches squelettiques. Ce sont des cellules qui présentent les caractéristiques stables morphologiquement et biochimiquement des lignées du muscle, du tissu adipeux, de l'os, du cartilage ou des cellules souches mésenchymateuses (Tang, Otto, et Lane 2004; Reznikoff, Brankow, et Heidelberg 1973; Pinney et Emerson 1989).

Dans le cas de notre projet, les C3H10T1/2 ont été choisies pour leurs caractéristiques de CSS et leur capacité à pouvoir se différencier en adipocytes et en ostéoblastes, nous permettant d'utiliser la même lignée cellulaire pour les deux types cellulaires et limiter la variabilité de l'étude.

Ce sont des cellules utilisées régulièrement en tant que lignée de CSS et qui ont déjà servi pour les études sur l'action du strontium (Fromigué et al. 2010; Peng et al. 2009; Fournier et al. 2012).

De plus, cette lignée a été montrée précédemment au laboratoire, comme étant mécanosensible, dans le cas de contraintes cisailantes, électriques ou de compressions (*Thèse Virginie Dumas*), où le VEGF était activé par le strontium (*Thèse Carole Fournier*) et induit par les contraintes mécaniques (*Thèse Virginie Dumas*).

En outre, l'utilisation d'un bioréacteur d'une capacité de 120mL pour les cultures 3D en impesanteur simulée nous imposait une grande quantité de cellules par expérimentation (entre 20 et 25.10⁶ de cellules) et donc l'usage d'une lignée avec une bonne capacité de réplication, en comparaison avec des CSS primaires, plus difficiles à obtenir en si grande quantité.

LES DOSES DE STRONTIUM UTILISEES

Dans cette étude, deux concentrations de strontium ont été utilisées, 3mM lors des traitements en 2D et 5mM pour les traitements en 3D (la durée d'induction plus longue justifiant la plus forte dose dans ce dernier cas). Ces concentrations peuvent paraître élevées en vue des dosages normalement assimilés par les patients traités au ranélate de strontium (entre 0,1 et 0,5 mM). Or, les doses efficaces de strontium utilisées dans les études *in vitro* les plus récentes sont du même ordre de grandeur (5 à 25 mM) et sont justifiées par des mesures de fortes concentrations de calcium (8 à 40 mM) dans l'environnement proche des ostéoclastes résorbants (Silver, Murrills, et Etherington 1988). Cet argument pourrait être alors valable pour le strontium, cependant des mesures locales aux environs d'ostéoclastes actifs doivent être effectuées dans des os d'animaux traités au strontium pour valider cette hypothèse. Avec une substitution de 1/10 du calcium par le strontium, on trouve le chiffre de 4 mM de strontium dans les UMR (Unités Multicellulaire de Remodelage), ce qui est plausible pour nos études, utilisant 3 et 5mM de traitement au strontium. A 10mM par contre, une certaine mortalité des cellules est observée montrant que dans nos cultures cette dose est trop élevée pour une différenciation allant jusqu'à 10 jours de culture.

LE ROTATING WALL VESSEL

Le Rotating Wall Vessel (RWV), développé et mis au point par la NASA, est l'appareil le plus communément utilisé dans les expériences *in vitro* en impesanteur simulée. C'est un bioréacteur cylindrique rotatif, qui va entraîner nos billes en rotation autour d'un axe central horizontal, limitant ainsi au maximum les forces appliquées sur les cellules (Figure 54). Ces conditions sont analogues à celles observées en impesanteur.

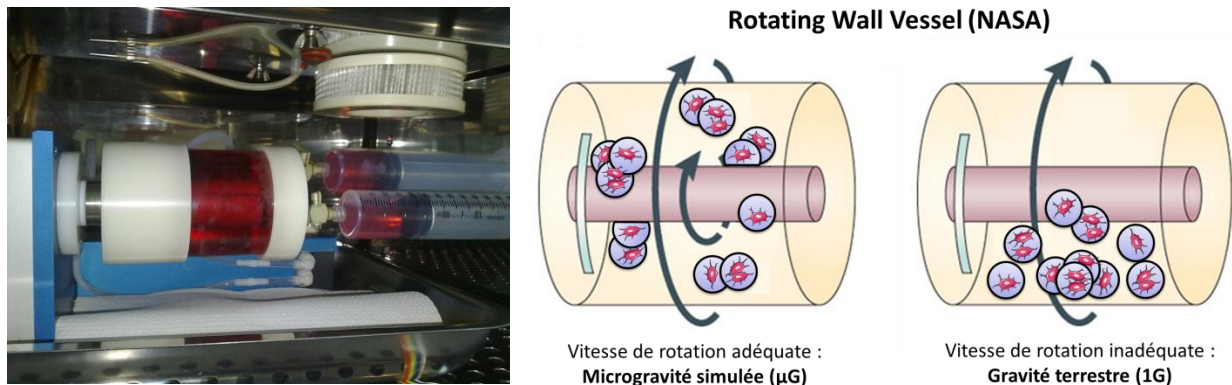


FIGURE 54 : LE ROTATING WALL VESSEL (RWV), SIMULATEUR D'IMPESANTEUR

Plus en détails, le mouvement de rotation de ce système empêche la sédimentation, créant une culture en suspension, optimisée, capable de supporter la croissance de cellules en trois dimensions sur des microbilles. Le bioréacteur fournit deux composantes essentielles de culture : (1) la rotation des billes et (2) l'oxygénation par diffusion. La rotation à la fois de la cuve, du milieu et des microbilles entraîne une minimisation maximum des contraintes de cisaillement et des dommages mécaniques appliqués sur les cellules. La rotation des billes est réalisée en ajustant la densité des agrégats de billes par rapport à la densité du milieu de culture et la vitesse de rotations du bioréacteur. L'oxygénation effectuée par la membrane permet la diffusion de l'air afin de maintenir des conditions de croissance appropriées tout en préservant les billes de la formation de bulles et donc de turbulences. Le système n'est pas parfait cependant, et il existe trois compromis principaux : (1) la vitesse terminale, (2) les forces de Coriolis et centrifuge, et (3) le transfert de masse réduit (Hammond et Hammond 2001). La vitesse terminale est générée par la nécessité d'équilibrer la pesanteur par rapport aux forces mécaniques égales et opposées appliquées sur les billes. Elle dépend du rayon des agrégats de billes et de la différence de densité entre le milieu et les agrégats. La vitesse terminale peut être minimisée en faisant correspondre ces densités lors de l'ajustement de la vitesse. Deuxièmement, les forces centrifuge et de Coriolis sont générées lorsque le vecteur de gravité est compensé par les forces mécaniques. A faibles vitesses de rotation, la force de Coriolis, en spirale, est prédominante et les grandes spirales produites entraînent l'impact des agrégats sur les parois du bioréacteur. A hautes vitesses de rotation, la force centrifuge domine et entraîne aussi l'impact des billes sur les parois. Par conséquent, la vitesse de rotation doit être ajustée afin de minimiser aussi ces deux effets. De même, lorsque les agrégats se développent par multiplication cellulaire et indexion d'autres billes, la vitesse de rotation doit être augmentée en conséquence, pour les maintenir en suspension. Cependant, une trop grande augmentation de la vitesse de rotation peut provoquer des impacts dus à l'effet centrifuge, comme vu précédemment. Cela limite en conséquence la taille des agrégats de billes qui peuvent être cultivées dans le bioréacteur sans endommager les cellules. Un transfert de masse maximum avec une vitesse terminale minimale peut être obtenu en utilisant des billes légères et un

milieu de faible densité. Ces limitations de cultures sont dépendantes de l'expérimentateur qui doit veiller quotidiennement au maintien d'une vitesse de rotation adéquate à une culture considérée comme étant en impesanteur simulé.

Le RWV présente un bon modèle d'impesanteur simulé, en limitant au maximum les forces et contraintes exercées sur les cellules en culture. Cependant, des limitations inhérentes au système existent. Il ne peut pas reproduire totalement les conditions rencontrées lors des vols spatiaux. La rotation du bioréacteur et l'oxygénation fournie induisent un mélange du milieu qui est normalement limité lors des vols spatiaux, dû au manque de convection du milieu (Voir 2. Une cellule isolée peut-elle être affectée par l'impesanteur ? *DONNEES THEORIQUES* p.11). Ainsi, les cellules reçoivent plus de nutriments et se déplacent de leur zone de rejet des déchets métaboliques beaucoup plus efficacement que les cellules cultivées en impesanteur réelle. Par conséquent, les expériences doivent être par la suite effectuées en vol spatial afin de confirmer les résultats obtenus avec le RWV.

Cependant, cette étude s'attachant à comparer des conditions traitées au strontium avec des conditions non-traitées, le même biais existe dans toutes les conditions, nous permettant de nous affranchir ici de ces limites.

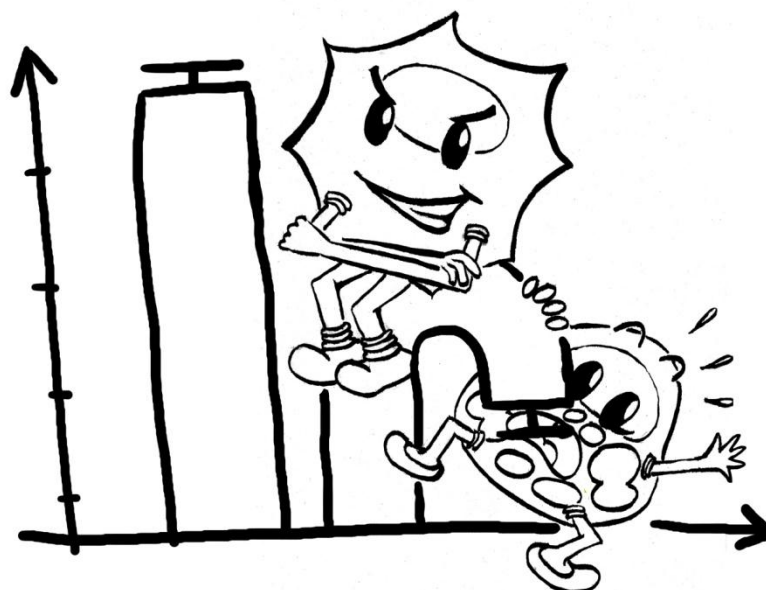
LA MINERALISATION DES BILLES ET SON ACTION OSTEOINDUCTIVE

L'hydroxyapatite (HA) est la principale composante minérale de l'os, de l'émail dentaire et de la dentine. Physiologiquement et cliniquement, les cellules ostéoblastiques sont confrontées à l'HA, étant largement utilisée en chirurgie orthopédique (Schwarzkopf, Olivieri, et Jaffe 2012) et dentaire (Al-Sanabani, Madfa, et Al-Sanabani 2013) parmi les matériaux phospho-calciques, du fait qu'il ne déclenche pas de réaction immunitaire majeure, comparé aux allogreffes (VandeVord, Nasser, et Wooley 2005) et du fait de son excellente biocompatibilité, en termes d'ostéoconduction (Nandi et al. 2008) et d'ostéoinduction (L. Lin, Chow, et Leng 2009). Ainsi, l'HA augmente l'adhésion, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes. L'adaptation des cellules aux particules d'HA leur permet d'induire le remodelage de leur matrice extracellulaire en stimulant l'activité des metalloprotéinases ainsi que celle de la phosphatase alcaline. L'HA permet même d'activer les adhésions focales par le réarrangement d'actine réalisée par la cofiline activée par Rac1 (Zambuzzi et al. 2011). Par ailleurs, l'hydroxyapatite inhibe l'adipogénèse, induisant donc seulement la différenciation des CSS dans la voie ostéogénique (*Résultats complémentaires thèse Anthony Perrier*).

Dans notre étude, afin d'optimiser l'ostéoblastogénèse des C3H10T1/2, dont la cinétique est plus lente que pour l'adipogénèse, les cellules ont étéensemencées sur des billes de plastique recouvertes de collagène sur laquelle de l'hydroxyapatite complexée au collagène a été préalablement déposée en solution. *In vivo*, le collagène représente 90% de la fraction organique de l'os et l'hydroxyapatite, qui est sa composante minérale, est complexée aux fibres de collagènes. Ces billes, de part leur composition, miment donc l'os, avec de l'hydroxyapatite facilement mobilisable et dégradable, contrairement à un biomatériau d'hydroxyapatite pure (Boskey et Robey 2013). De plus, le collagène des billes est aussi facilement dégradable par les collagénase sécrétées par les cellules, nécessaire à la différenciation en ostéoblastes (Yu et al. 2013; Yu et al. 2012), car permettant de dévoiler les motifs RGD (Acide arginyl-glycyl-aspartique) cachés dans la triple hélice de collagène qui aident à l'attachement cellulaire (Di Lullo et al. 2002; Davis et al. 2000). Ces billes collagénées et recouvertes d'hydroxyapatite apparaissent donc comme de bons support pour l'ostéogénèse, la combinaison

collagène-HA étant régulièrement utilisée lors des développement de substituts osseux (Villa et al. 2014), déjà actuellement commercialisés et approuvés par la FDA : Healos® (Depuy), Collagraft® (Zimmer), Ossimend® (Collagen Matrix), ou Mozaik® (Integra LifeSciences).

Dans toutes ces applications, c'est souvent la réactivité de surface de l'HA avec le milieu biologique qui est le point clé. Il est aussi largement reconnu que l'HA permet l'adsorption des protéines (par exemple les acides aminés ou la fibronectine du milieu de culture) (Woodruff et al. 2007), augmentant l'adhésion ostéoblastique (Dalby et al. 2002). Cette augmentation de l'adhésion cellulaire est primordiale, car elle conditionne la biocompatibilité du matériau (Zambuzzi et al. 2011). C'est pourquoi nos billes sont préalablement incubées 72h dans du milieu de culture avant l'ensemencement des C3H10T1/2. Cette précaution permet aussi de vérifier le développement d'éventuelles contaminations lors de la fabrication des billes minéralisées, qui demande plusieurs étapes à risques, afin d'ensemencer dans le bioréacteur une culture bien stérile, et de ne pas contaminer la membrane oxygénante.



RESULTATS

Revue	93
Les GTPases comme acteurs clés dans l'adaptation des cellules à l'impesanteur	
Article 1	121
La GTPase RhoA contrôle L'inhibition de l'adipogénèse par le strontium (modèle de cellules multipotentes)	
Résultats Complémentaires	140
Conclusion et discussion	148
Article 2	149
Le chlorure de strontium stimule les RhoGTPases pour contrer les altérations de l'engagement des cellules multipotentes liées à l'impesanteur simulée	
Résultats complémentaires	174
Conclusion	177

REVUE

LES GTPASES COMME ACTEURS CLES DANS L'ADAPTATION DES CELLULES A L'IMPESANTEUR

La première partie de ce manuscrit de thèse met en évidence un équilibre entre adipogénèse et ostéogénèse très finement régulé. Un seul changement dans les différents facteurs peut pousser les cellules souches squelettiques à privilégier une voie de différenciation par rapport à une autre. C'est le cas des contraintes mécaniques où leur absence a été montrée comme induisant l'adipogénèse. Le cytosquelette des cellules souches en conditions d'impesanteur apparaît aussi désorganisé, avec une perte des fibres de stress, des cellules plus rondes et moins adhérentes. Tous ces changements peuvent être expliqués par les RhoGTPases dont l'activation est très fortement dépendante du contexte mécanique de la cellule. Par ailleurs, elles interviennent dans de nombreuses voies de régulation en plus de moduler le cytosquelette des cellules.

La revue qui suit met en évidence le rôle central de ces GTPases dans les différentes voies altérées par la perte de gravité. Elle s'attache d'abord à expliquer les principes généraux définissant la sensibilité des cellules. Puis, la relation entre les GTPases et les différents changements morphologiques ou de signalisation seront détaillés. Enfin, les perspectives montreront l'importance potentielle de l'observation des GTPases en imagerie cellulaire afin de mieux comprendre localement l'impact de l'impesanteur *in vitro*.



Submitted in BioMed Research International, for the special issue
"How Microgravity Affects the Biology of Living Systems" of November 2014,
Hindawi Publishing Corporation

Review Article

RhoGTPases as key players in cell adaptation to microgravity

Fiona LOUIS^a, Christophe DEROANNE^b, Betty NUSGENS^b, Laurence VICO^a,
Alain GUIGNANDON^{a*}

a: INSERM U1059, Université Jean Monnet, Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, F42023 Saint-Etienne France

b: Laboratory of Connective Tissues Biology, GIGA, Université de Liège, B-4000 Sart Tilman, Belgium

Running title: RhoGTPases in microgravity

* Corresponding author

Alain GUIGNANDON
INSERM U1059, LBTO
Université de Lyon à St-Etienne
Faculté de Médecine
15 rue Ambroise PARE
F-42023 Saint-Etienne cedex 2
Email: Alain.Guignandon@univ-st-etienne.fr

ABSTRACT

A growing number of studies are revealing that cells reorganize their cytoskeleton when exposed to conditions of microgravity. Most, if not all, of the structural changes observed on flown cells can be explained by modulation of RhoGTPases, which are mechanosensitive switches responsible for cytoskeletal dynamics. This review identifies general principles defining cell sensitivity to gravitational stresses. We discuss what is known about changes in cell shape, nucleus, and focal adhesions and try to establish the relationship with RhoGTPase activities. We conclude by considering the potential relevance of live imaging of RhoGTPase or cytoskeletal structures in order to enhance our understanding of cell adaptation to microgravity-related conditions.

ABBREVIATIONS

ALP : Alkaline phosphatase
C/EBP : CCAAT-enhancer-binding proteins
cAMP : Cyclic adenosine monophosphate
CREB : cAMP response element-binding protein
ECM : Extracellular matrix
ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinase 1/2
FAK : Focal adhesion kinase
FRET : Förster resonance energy transfer
GAP : GTPase- activating proteins
GDI : Guanine dissociation inhibitors
GDP : Guanosine diphosphate
GEF : Guanine nucleotide exchange factors
GPCR : G protein-coupled receptor
GTP : Guanosine triphosphate
Hace1 : HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase 1
LIMK : LIM kinases
LINC : Proteins linking nucleoskeleton and cytoskeleton complexes
MMPs : Matrix metalloproteinases
MSC : Mesenchymal stem cell
NF- κ B : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMM-II : non-muscle myosin II
Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
PAK : p21-activated kinase
Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RhoA : Ras homolog gene family, member A
ROCK : Rho kinase
ROCK2 : RhoA-associated protein kinase 2
ROS : Reactive oxygen species
RWV : Rotating wall vessels
SEM : Standard Error of the Mean
Src family kinase : Family of non-receptor tyrosine kinases
TCF/LEF : T-cell factor-1 (Tcf-1) and lymphoid enhancing factor-1 (Lef-1)

Introduction

Microgravity has been demonstrated to have profound effects on both cellular and molecular levels, including changes in cell morphology [1, 2], alterations of proliferation, growth or differentiation [3, 4] modification of gene expression [5–7] and changes in signal transduction cascades [5, 8]. Single undifferentiated cells *in vitro* respond to altered conditions of gravity, but not all sensors and upstream regulators are known, which limits our understanding of cell sensitivity to microgravity-related conditions and even more to microgravity per se.

There are numerous observations strengthening the idea that cytoskeletal structures and cell surface receptors connected to them play an important role in the regulation of the differentiation potential of stem cells. As changes of shape and of the inner cytoskeletal architecture are common cell responses under conditions of real or simulated microgravity, the idea of cytoskeletal involvement in the cellular response to microgravity seems obvious. Moreover, stem cells or multipotent cells are recognized as being sensitive to mechanical stresses, which are known to influence cell commitment. The idea that not only terminally differentiated cells but also multipotent cells are sensitive to microgravity explains why even limited effects on cell commitment could have dramatic consequences. Small GTPases of the Rho family are known to control several aspects of cell dynamics (vesicular transport, traffic, cytoskeleton turn-over) and appear to be the key players when trying to gain a better understanding of the effects of microgravity on differentiated and multipotent cells.

This review first attempts to highlight the fact that structures involved in mechanotransduction pathways are responsible for adaptation to microgravity: it

will be explained that structural changes observed in cells exposed to real and simulated microgravity may result from specific RhoGTPase regulations. Then, the degree to which the effects of microgravity are important controllers of multipotent cell commitment will be discussed, highlighting the critical role of RhoGTPases in these regulations. The monitoring of RhoGTPase activities in conditions of microgravity is still a challenge as it is a dynamic process that controls other highly dynamic processes such as actin polymerization or focal adhesion turn-over. In order to decipher cell adaptation in conditions of microgravity, the community is in need of a live imaging technology that can be set up in flight! We are conscious of all the difficulties of using Förster resonance energy transfer (FRET)-based biosensors dedicated to RhoA (Ras homolog gene family member A) and Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), two important actors of this GTPases family, under conditions of microgravity, and we are convinced that research groups that are successful with these types of sensors will provide very exciting results that will eliminate many confounding factors related to conditions of microgravity, such as launch vibrations. We predict that many specific GAP and GEF (respectively RhoGTPases inhibitors and stimulators) will turn out to be key players in cell adaptation to microgravity-related conditions in the future.

Mechanotransducers as gravity sensors

Discussions of whether an *in vitro* single cell or a cell population can sense changes in the gravitational field are very controversial. The currently most unknown research area involves the mechanism by which the physical event of g-force susception (by invagination, sedimentation or buoyancy) becomes the biological process of g-force perception. Despite this, an enormous body of experimental data undoubtedly indicates that

several types of cultured cells are sensitive to gravity. If, in fact, cells do not fall (collapse), it is because they are supported in some way. This support takes the form of a mechanical stress, set up by the intermolecular forces in response to the distortion produced by gravity. In conditions of free fall; such as those found in an orbiting vehicle; all the elements in a cell fall in exact response to gravity. There is thus no distortion produced, and consequently, there is no mechanical stress.

It seems that undifferentiated cells have structural elements that may play the role of “gravitational sensors” and “sense” the intensity of a mechanical tension, and that several intracellular processes can depend on the value of the gravitational force. Theoretical considerations suggest that the forces involved are too small to trigger any response to the changed environment. Several research teams think that these effects are mostly caused by changes at the tissue and organ level [9] and that such environmental changes are stronger and more diverse [10] (e.g., lung, heart and kidney become larger while spleen or pancreas get smaller in rats [11]). In conclusion, gravitational effects have been considered significant for cells with a diameter of no less than 10 μm [12]. Thus, microgravity seems to alter mammalian cells as compared to bacterial cells which are normally too small.

Actors in the mechanotransduction chain represent key elements involved in microgravity adaptation. Nature provides clear examples of defined mechanoreceptors in eukaryotes such as the statoliths in plants and the otoliths of the inner ear in most species of vertebrates. Similar specialized cells of the sense organs detect pressure (touch) and vibrations, and communicate these physical stimulations to the nerves of the afferent pathway up to the brain.

It thus seems that undifferentiated mammalian cells do indeed have structural elements that may play the role of a “gravitational sensor” and “sense” the intensity of a mechanical tension, and that many intracellular processes (adhesion, proliferation, survival, contractility, migration, extracellular matrix (ECM) architecture and gene expression...) can depend on the intensity of the gravitational force. The identification of cell structures capable of acting as gravisensors in *in vitro* cells still remains a problem. The general view of mechanosensing is that the overall cell is sensitive and not a particular element.

In our opinion, the most significant element (*primum movens*) that may impact on cytoskeletal dynamics under microgravity is the displacement of the nucleus. The location of the nucleus is probably dictated by a tension equilibrium between the cyto- and nucleoskeletons and we can imagine that these tensions are constantly changing (in response to signals), and that the nucleus probably oscillates continuously [13]. A microgravity environment may influence the oscillating behavior of the nucleus [14] and then trigger a series of mechanical adjustments that may modulate cell shape and structures, as well as functions by way of transcription activities.

In response to changes in nucleus location, cytoskeletal structures and integrins might be solicited for cell adaptation. The cytoskeleton is a network of three interconnected systems of filaments: the actin microfilaments, the microtubules, and the intermediate filaments. They condition the shape of the cells and the major mechanical functions such as adhesion, polarization, directional migration, as well as proliferation, survival or apoptosis, gene expression and architectural organization of their supporting scaffold [15].

Experiments in real and simulated conditions of microgravity have shown that cytoskeletal

modulations can occur quickly after variations in gravity have taken place. Numerous articles have reported on changes within 30 min of the onset of a microgravity simulation, affecting everything from focal adhesions to signal transduction. The reorganization of the cytoskeleton is believed to govern the modifications in size and shape of cells and nuclei as well as the patterning, number and maturation of focal adhesions. The structures of the cytoskeleton, nuclei, and integrins may claim, to varying degrees, to fulfill the role of gravisensors [16].

The most likely candidates to assume the role of these structures are various elements of the cytoskeleton, the nucleus, intracellular organelles and also certain cell surface receptors (integrins), which interact both with cytoskeletal structures and the extracellular matrix. These structures are able to sense constraints and deformations in the matrix which are caused either by a gravitational or mechanical field and convert this signal into intracellular messengers, which then give rise to a cellular response to the changes in gravity [13, 17]. It is also noteworthy that the cytoskeleton and integrins are not the primary sensors but react in response to their regulatory proteins (controllers of polymerization/destabilization agent).

All the structural changes observed in cells subjected to microgravity-related conditions are dictated/controlled by dynamic molecular switches of the GTPase family. Small RhoGTPases mainly control the regulation of intracellular traffic and are responsible for cytoskeletal dynamics [18].

RhoGTPases, mechanosensitive molecular switches

RhoGTPases, found in all eukaryotic cells, are key regulatory molecules which link surface receptors to the organization and turnover of

the cytoskeleton, govern the formation of cell–matrix adhesions, and uphold the transcriptional control of gene expression, cell survival and proliferation [19]. They are members of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins and are divided into three major classes: RhoA, Rac1, and Cdc42. GTPases are molecular switches that use a simple biochemical strategy to control complex cellular processes. They switch between two conformational states: a guanosine triphosphate (GTP)-bound ("active") state and another ("inactive") state related to guanosine diphosphate (GDP). In their inactive forms, RhoGTPases are sequestered in the cytoplasm, while upon signaling identified by integrins and growth factor receptors, they switch to their active forms and translocate to the cell membrane [20]. There, they activate distinct and specific effector molecules which in turn regulate the organization of the cytoskeleton and cell–matrix adhesions, thus controlling cellular activities such as adhesion, and also affect cell proliferation and the expression of specific genes (Fig.1) [15]. The cycle between the active and inactive forms is under the direct control of three groups of regulatory proteins. The guanine nucleotide exchange factors (GEFs) catalyze the exchange of GDP for GTP to activate Rho proteins. The Rho proteins are then deactivated by GTPase-activating proteins (GAPs) which increase the intrinsic GTPase activity of the Rho protein, leading to the hydrolysis of GTP to GDP. The third group of proteins involved in the cycle of Rho signaling is guanine dissociation inhibitors (RhoGDI), which hide the isoprenyl groups of GTPases, an action that promotes the sequestration of inactive GTPases in the cytosol. The RhoGDIs also inhibit the release of GDP from the GTPase and contribute to the maintenance of GTPases in an inactive state. The Rho protein cycle is stimulated by agonists acting through G protein-coupled receptors (GPCRs), tyrosine kinase receptors, cytokine

receptor activation, and mechanical stresses that mainly govern the activity of the GEFs [21]. The best known actions of the RhoGTPases on mechanical parameters of the cytoskeleton can be underscored by expression of constitutively active RhoA and Rac1 in cell lines. These models show that RhoA activation leads to better cell spreading but lower mechanical properties, while Rac1 activation induces mechanotransduction [22]. As we assume that exposure to gravitational stress is a mechanical stimulation, Rac1 might be rapidly induced in microgravity-related conditions. These results reveal the importance of RhoGTPases on mechanosensing, cell shape adaptation or signal transduction. We will summarize below the different controls they can have on cellular mechanisms and metabolism.

RhoGTPases control cytoskeleton dynamic

In microgravity, a qualitative and quantitative analysis of the structures of F-actin, β -tubulin and vinculin has revealed a higher density of filamentous actin and a decreased organization in stress fibers. Exposing mesenchymal stem cells (MSC) to low gravity affected the distribution of the different filaments and more specifically led to a significant reduction of the F-actin fibers [23, 24], extended filopodia, increased perinuclear distribution, and decreased density [25, 26]. Moreover, other research groups have found evidence of an accumulation of actin at the cell border [27, 28]. This loss of stress fibers is accompanied by an increase in monomeric G-actin content within the cells. The preceded alterations may be explained by a preferential reduction of RhoA activity.

Indeed, the activation of RhoA or Rac1 leads to the assembly of contractile actin:myosin filaments, protrusive actin-rich lamellipodia, and protrusive actin-rich filopodia, which in turn give rise to both the formation (actin

polymerization) and the organization (filament bundling) of actin filaments. Thus, a number of studies (e.g., [29]) have shown that Rho kinase (ROCK) modulates the non-muscle myosin II (NMM-II) activity by phosphorylation. Another protein, Cofilin, regulates actin polymerization and filament elongation. Its phosphorylation leads to inactivation and occurs primarily through LIM kinases (LIMK), which are activated by Rac1-dependent kinases. Moreover, LIMK-dependent phosphorylation of cofilin can also be induced by RhoA acting through its target ROCK, which may be an important event in the stabilization of actin:myosin filaments [30]. Microgravity leads to an alteration of the actin cytoskeleton and consequently to a decrease of integrin signaling that may be caused by the inhibition of RhoA activity. The absence of gravity increases the G-actin form, which reduces cofilin phosphorylation, and is consistent with a decrease in focal adhesions and thus stress fibers [31].

Finally, if a constitutively active RhoA is overexpressed, a recovery stress of the fibers is enabled, similar to what can be observed under normal gravity, and integrin signaling is restored as shown in MSC [32].

Microtubules play critical roles in eukaryotic cells. They are key structural elements of the mitotic spindle apparatus during mitosis and interphase, and serve as tracks upon which motor proteins transport vesicles and other components move throughout the cell [33]. Several studies have mentioned perinuclear clustering in the microtubular network during microgravity [24, 34]. Also, the loss of the radial structure of microtubules has been observed after long stretches of time (4h) in microgravity [35].

Microgravity has also been proposed to influence microtubules by affecting the self-organization of filaments. According to the

theory on self-organization and in a series of *in vitro* studies with a change in gravity direction [36, 37] and microgravity [36], it was clearly shown that microtubule self-organization is sensitive to the direction and the magnitude of gravity, which may explain the results obtained under microgravity. Furthermore, the observed disorganization of microtubules may lead to a reduced rate of chromosome segregation during mitosis, while alterations of actin microfilaments and focal adhesions may also slow down cytokinesis and thus cell proliferation.

RhoGTPases regulate microtubule dynamics in different ways. Rac1 can phosphorylate at Ser16 of the microtubule plus-end-binding proteins (stathmins), which occurs in response to a number of extracellular stimuli [38]. The effect of RhoA on microtubule dynamics is likely to be context-dependent. For instance, in migrating fibroblasts, RhoA promotes the formation of stabilized microtubules. Also, microtubules play a major role in defining cell shape and polarity through the specific interaction of their plus-ends with proteins at the cell cortex. This plus-end capture of microtubules has been attributed to a number of plus-end-binding proteins, whose activities are influenced by RhoGTPases [15]. Altogether, results on microtubules observed in conditions of microgravity may be explained by an alteration of the RhoA and Rac1 activities.

Microgravity has also had an impact on intermediate filaments, which after 12 min in microgravity appeared as large bundles and aggregates in the vimentin network, i.e., the most distributed of all intermediate filament proteins [39]. ROCK phosphorylates intermediate filament proteins, specifically at the cleavage furrow during cytokinesis. This cleavage furrow-specific phosphorylation plays an important role in the breakdown of local intermediate filaments and enables an efficient separation of intermediate filament networks

[40]. In fact, RhoA and Rac1 induce phosphorylation and reorganization of vimentin through kinases such as RhoA-associated protein kinase 2 (ROCK2), p21-activated kinase (PAK), Src kinase (family of non-receptor tyrosine kinases) and tyrosine kinases [41].

Concerning lamins, which are nuclear intermediate filaments, Uva et al. showed DNA fragmentation in glial cells after 30 min of microgravity and explained the phenomenon by caspases causing lamina to collapse and chromatin to condense [42]. Proteins linking nucleoskeleton and cytoskeleton complexes (LINC), thus connecting lamina to the cytoskeleton, have been found. When it comes to laminopathy models, in which this LINC complex is disrupted, they lead mostly to RhoA inhibition and lowered cytoplasmic elasticity, while actin and focal adhesion structures are mildly affected [43]. Changes in nuclear structures, that we identified earlier as an important initiator of microgravity effects [14], might explain the RhoA activity inhibition and changes in cell tension evoked under microgravity.

Rac1 was shown to accumulate in the nuclear envelope in addition to being expressed in the nucleoplasm, and seemed to have the same pattern as that reported for lamin B [44]. This Rac1 accumulation was proven to promote cell division. In microgravity, the altered proliferation observed by Dai et al. or Benavides Damm et al. [45, 46] is controversial since Yuge et al. [47] rather found an increased proliferation in human mesenchymal stem cells. We thus suggest, based on our results obtained on rat osteosarcoma [48], that the lower proliferation might be explained by a reduced Rac1 activity in conditions of microgravity.

RhoGTPases as regulators of cell adhesion and matrix remodeling

Integrins are transmembrane receptors that mediate the attachment between a cell and its surroundings, such as other cells or the ECM. In signal transduction, integrins convey information about the chemical composition and mechanical status of the environment into the cell. Therefore, in addition to transmitting mechanical forces, they are involved in cell signaling and the regulation of cell cycles, shapes, and motility.

Among the ligands of integrins can be mentioned fibronectin, vitronectin, collagen, and laminin. Then, adapter proteins such as talin and vinculin link the cytoskeleton to integrins, which attach the cell to the substrate, forming a focal adhesion. A variety of signaling proteins are associated with focal adhesions, including focal adhesion kinase (FAK), which is an important mediator of signaling at these centers. Forces are also transmitted to the substrate at these sites. In fibroblasts, local forces correlate with the area of focal adhesions, and actomyosin contractility blocking results in a rapid disruption of focal adhesions [49].

In conditions of microgravity, a reduced focal adhesion-related area (frequently reported [50, 51]) can be explained by the lower tension applied to the cytoskeleton. This situation can be associated with an inactivation of RhoA, and as a result by decreased fibrillogenesis (fibronectin collagen) dramatically limiting integrin signaling. The proof of a reduced integrin signaling is that MSC have been observed to display changes in the expression levels of collagen-specific integrins after 7 days of cultivation in a rotational bioreactor [52]. In fact, activated expression of the $\alpha 2$ -integrin has been seen during the course of MSC differentiation to osteogenesis [28]. In addition, Loesberg et al. found a down-

regulation of $\alpha 1$, $\beta 1$ and $\beta 3$ -integrins after 48h of simulated microgravity [53].

$\beta 1$ integrin has been shown to be important for mediating the response of MSC to mechanical stimulation [54]. Upon application of fluid shear stress, an increase in alkaline phosphatase (ALP) activity and expression of osteogenic markers are observed, along with the activation of FAK and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). But when $\beta 1$ integrins are blocked, FAK and ERK1/2 activation becomes inhibited [54]. Phosphorylation of FAK has also been demonstrated to be important for osteogenic differentiation of human MSC in response to tension [55]. In microgravity-related conditions, the limitation of integrin signaling can be a plausible explanation for the reduced osteogenesis.

In addition, limitation of the integrin-mediated response can also reduce important negative regulatory pathways. Thus, growth of preadipocytes on a fibronectin matrix inhibits adipocyte differentiation and this effect is overcome when actin filaments are disrupted and promotes a rounding-up of cells [56]. However, $\beta 1$ in association with $\alpha 5$ binds to fibronectin, and Liu et al. [57] reported the presence of an expression switch from $\alpha 5$ to $\alpha 6$ at the growth arrest stage of differentiation, which is consistent with an ECM change observed during adipogenesis. This switch is necessary in order to go from proliferation to differentiation of preadipocytes and can be explained by integrins $\alpha 6\beta 1$ that bind to laminin and can thus interfere with chromatin and gene regulation.

These two integrins $\alpha 5$ and $\alpha 6$ are coordinately regulated by Cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Interestingly, cAMP has been shown to be activated in microgravity [58–60]. RhoA and cAMP have antagonistic roles in regulating

cellular morphology [61]. Thus, the excessive production of cAMP in microgravity may explain the limitation of RhoA activation during adipogenesis followed by the integrin switch of $\alpha 5$ to $\alpha 6$, to promote adipogenesis. Also, it is well established that cAMP enhances the expression of both CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) α and β [62, 63] and initiates adipogenesis via the transcription factor CREB (cAMP response element binding protein) [64].

Concerning Rac1, cell adhesion to fibronectin ($\alpha 5$ integrin) but not to laminin ($\alpha 6$ integrin) is particularly efficient in activating Rac1 [65], leading to osteogenesis via β -catenin/wnt pathways [66]. In microgravity, fibrillogenesis is rapidly limited [67, 68], which explains the delay or absence of osteogenesis in multipotent cells. The extracellular domains of cadherins and β -catenin provide a link to α -catenin and the actin cytoskeleton [69]. Upon tyrosine phosphorylation, β -catenin also plays a significant role in signaling when translocated to the nucleus to regulate cell proliferation [70].

Noritake et al., [71] have explained the increase in Rac1 during osteogenesis: until subconfluence, cell adhesions accumulate E-cadherins at the sites of cell-cell contacts which induce Rac1, and thus actin-meshwork formation and β -catenin, leading to osteogenesis. In fact, before E-cadherin-mediated cell-cell adhesion is established, GDP-Rac1 is sequestered in the cytosol by Rho GDI. When E-cadherins accumulate, GDP-Rac1 is converted to GTP-Rac1, through the action of a GEF, and is targeted to the plasma membrane releasing β -catenin linked to E-cadherin, which can go to the nucleus [72]

In addition, cell-to-cell physical contact via N-cadherin also plays a crucial role in regulating osteoblastic activity such as alkaline phosphatase activity and β -catenin signaling [73, 74]. Consequently, reduced cell-cell

adhesion observed in microgravity, due to limited proliferation, may induce a decrease in Rac1 action and osteogenesis.

Moreover, it has been largely described that matrix rigidity affects osteogenesis. MSC grown on collagen-I stiff gels (linking to $\alpha 1$ or $\alpha 2$ - $\beta 1$ integrins) have demonstrated activated osteogenesis, whereas softer collagen-I gels prime MSC for a myogenic lineage [75]. However, cytoskeleton and the dynamic mechanical balance that exists between cells and their ECM support appear as major players in several mechanotransduction pathways [76]. Microgravity decreases the expression of collagen I [77–79], induces matrix metalloproteinases (MMP) production and reduces the level of fibrillar collagen. Thus, it could be expected that altered conditions of gravity may change the mechanical properties of ECM (i.e., the stiffness). Several studies, e.g., Mc Beath or Shih et al. [80, 81], have shown that osteogenic differentiation becomes increased on stiffer matrices, as evident by type-I collagen, osteocalcin, Runx2 gene expressions, ROCK, FAK, and ERK1/2 induction and alizarin red S staining for mineralization. Consequently, FAK affects osteogenic differentiation through ERK1/2, whereas RhoA and ROCK regulate both FAK and ERK1/2 [81].

In microgravity, an initial modification of cytoskeletal dynamics might be at the origin of the following vicious circle: remodeling of a cytoskeleton is associated with a reduced internal tension (contractility) leading to the dispersion of FA. With such a reduction in FA, the cell tension cannot be restored and fibrillogenesis might be limited. Matrix deposition limitation and MMP activation (Rac1 dependent process [82, 83]) may further reduce the matrix stiffness thus amplifying the dispersion of FA, reducing cell tension and fibrillogenesis. After a short exposure (from minutes to hours) to microgravity-related conditions (before fibrillogenesis, MMP

production), the matrix stiffness is not modified. We can thus speculate that the ability of the cells to detect the stiff matrix they are normally seeded on has become rapidly impaired. Mechanical information is normally conveyed by ECM and cells by FA adaptation following tensegrity principles (equilibrium of internal and external tension) [13]; in microgravity it seems that the displacement of the nucleus (sensitive to G) conveys the mechanical stimulus and from a tensegrity perspective, the cell adapts to the reduced tension by lowering the ECM tension (interruption of fibrillogenesis and MMP production). The short-term adaptation of the cell to microgravity that we have described up to now seems to be characterized by a rapid reduction of RhoA and an increased Rac1 activity.

RhoGTPases in stem cell commitment

In simulated microgravity, cellular morphology is drastically changed after 7 days. The MSC appear rounder and less firmly attached to their substrate than under conditions of normal gravity. Rather, they are very spread out and display a fibroblastic morphology [28].

Since the work by McBeath et al., we know that the shape of a cell affects its differentiation potential [80]. Thus, MSC that have been allowed to adhere over a larger area are able to differentiate towards the osteogenic lineage while cells adhering to a smaller area are restricted to the adipogenic lineage. These impacts on lineage commitment by mesenchymal stem cells seem to be regulated by shape-induced changes in the RhoGTPase activity and cytoskeletal tension [84]. Yao et al. [85] showed that the cell shape itself is an inherent cue to regulate stem cell differentiation, both with and without external chemical induction factors. Thus, according to McBeath et al. [80], expressing dominant-negative RhoA causes MSC to become

adipocytes, while constitutively active RhoA induces osteoblastic or myocytic differentiation [86, 87].

Concerning Rac1, it has been shown to promote cell adhesion and spreading, and thereby to prevent the cell shape change and the establishment of the cortical actin structure necessary for adipocyte formation [85]. Adhering cells are characterized by an elaborate network of stress fibers and focal adhesions, and are thus more prone to adopt a fibroblastic cell shape reflecting cytoskeleton tension [88, 89], which seems to be altered in conditions of microgravity.

The cell shape may also depend on the available substrate area and hence the cell density. However, if cellular growth is reduced in microgravity, the cell density will also be altered. Gao et al. [86] found that levels of RhoA activity did not vary substantially, but that the Rac1 activity was significantly higher in well-spread cells during early differentiation than in high-density cells.

They also demonstrated that Rac1 is necessary for osteogenesis and that constitutively active Rac1 inhibited adipogenesis, even if it is important for adipose commitment. Liu et al. [57] showed that an increase in preadipocyte density inhibited the RhoA activity, and that a downregulation of the RhoA-ROCK pathway was required for both adipose lineage commitment and maturation [80, 87]. An increased cell density thus appeared to be critically important.

GTPases have also been shown to act in the cell cycle, mitosis and cytokinesis. RhoGTPases influence the cyclin dependent kinase (cdk) activity during the G1-Phase of the cell cycle. Thus, RhoGTPases control the organization of the microtubule and actin fibers during cell cycling. An inhibition of RhoA or Rac1 blocks the G1 progression in a variety of mammalian

cell types [90, 91]. Also, Rac1 (but not RhoA) stimulates cyclin D1 transcription mediated by NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) [92, 93]. Thus, the necessity to down-modulate the Rac1 activity in adipogenesis is that Rac1 may prolong proliferation of preadipocytes, which is consistent with the reported effects of Rac1 on cyclin D1 [65, 94, 95]. In fact, Rac1 accumulates in the nucleus during the G2 phase of the cell cycle and promotes cell division [44].

Concerning the cell division itself, it has been shown that actin:myosin filaments, under the control of ROCK, are required at the cortex to allow positioning of the centrosomes [96]. RhoA also plays a crucial role in the contractile ring function [97].

Microgravity affects the growth, proliferation and differentiation of osteoblasts. Since the inhibition of RhoA, observed under microgravity, blocks G1 progression [90, 91], this may explain the altered proliferation and differentiation of osteoblastic cells.

Furthermore, several cytoskeletal components, including Rac1 GTPase activating protein 1 (Rac-GAP1) and Tropomodulin 1, segregate asymmetrically during stem cell division, and overexpression of these proteins may enhance MSC commitment, as already proven with asymmetrical divisions of hematopoietic stem cells to progenitor cells [98].

RhoGTPases and Wnt/ β -catenin signaling crosstalk

Three Wnt signaling pathways have been characterized: the canonical Wnt pathway, the noncanonical planar cell polarity pathway, and the noncanonical Wnt/calcium pathway. The canonical Wnt pathway leads to regulation of gene transcription, the noncanonical planar cell polarity pathway regulates the cytoskeleton via a RhoGTPase regulation that is

responsible for the shape of the cell, and the noncanonical Wnt/calcium pathway regulates calcium inside the cell [99].

Mellor et al. found that Wnt signaling was inhibited in conditions of microgravity [100] and mouse osteoblasts subjected to simulated microgravity were found to have lower levels of several components of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. This may indicate, even indirectly, the activation of an adipogenic program under microgravity [101]. Moreover, Wan et al. [102] recently demonstrated a changed RhoA and β -catenin signaling after 1 and 2.5 h, respectively, in clinorotated osteoblasts. They revealed that both the RhoA activity and the TCF/LEF (T-cell factor-1 and lymphoid enhancing factor-1) activity, a β -catenin recruiter, were downregulated by unloading. However, the inhibition of β -catenin signaling blocked the unloading-induced RhoA suppression, and dominant negative RhoA inhibited the TCF/LEF suppression, revealing a regulation loop between β -catenin, RhoA and TCF/LEF. Furthermore, while β -catenin signaling seemed to be required for microgravity regulation of RhoA, this response was not mediated by the actin cytoskeleton or intracellular tension [102]. The same was observed for Rac1/ β -catenin signaling [66].

The Wnt canonical pathway involves the translocation of β -catenin to the nucleus, and β -catenin has been shown to promote osteogenic differentiation in early osteoblast progenitors *in vivo* [103]. In contrast, other studies have suggested that canonical Wnt signaling may actually promote stem cell renewal and inhibit osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells *in vivo* [104], as well as promote stem cell renewal in human MSC derived from bone marrow [105]. Arnsdorf and colleagues [106] investigated the role of non-canonical Wnt signaling in mechanically induced osteogenic differentiation of MSC. Exposure of MSC to oscillatory fluid flow

resulted in a translocation of β -catenin [107] and an upregulation of Wnt5a, which is capable of inducing both canonical and non-canonical pathways. Wnt5a is also necessary for the flow-induced activation of RhoA. However, the inhibition of Wnt5a did not affect the β -catenin translocation, which may instead be regulated by cadherin-catenin signaling. In addition, Santos et al. [108] showed that the activation of the RhoA/ROCK pathway by Wnt5a induced a down-regulation of adipogenic markers. It was further reported that RhoA could also be activated by Wnt3a, one of the canonical Wnt family members [109], and that an inhibition of intracellular β -catenin decreased the RhoA activity [110].

Kim et al. [111] also found that Wnt signaling regulated the MSC differentiation into cardiomyocyte-like cells with a concomitant downregulation of RhoA and upregulation of Rac1. Concerning Rac1, it was shown to be a critical regulator in shear stress-driven β -catenin signaling in osteoblasts [66], and constitutively active Rac1 mutant caused a significant enhancement of the TCF/LEF activity.

These studies demonstrate that Wnt signaling is important for mechanically induced differentiation, through RhoA or Rac1 pathways. So, in conditions of microgravity, reduced RhoA, cell shape and migratory behaviors can be explained by Wnt and β -catenin signaling. Finally, RhoGTPases are regulated by Wnt signaling but in return, β -catenin location (translocation) is dependent on RhoGTPases. This intricate interplay between both regulatory elements makes them particularly important for the interpretation of microgravity effects.

RhoGTPases and oxidative stress

One of the first targets of Rac1 to be identified was p67phox, an essential structural

component of the NADPH oxidase complex [112]. Since then, Rac1 has been reported to promote reactive oxygen species (ROS) production in many cells, and to mediate the activity of the Nox family [113, 114]. Consequently, Rac1 activation leads to the generation of ROS enabling adipogenesis commitment [115], and reducing osteoblastogenesis [116, 117]. Moreover, GTPases act on the antioxidant master gene Nrf2 (Nuclear factor-like 2), which activates a protective adaptive response to oxidative stress through transcriptional activation of antioxidant defense genes [118].

RhoA is involved in Nrf2 phosphorylation, which is necessary for its activation [119]. Nrf2 is a transcription factor for Hace1 (HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase 1), and Hace1 binds and ubiquitylates Rac1 when the latter is associated with NADPH oxidase, thus blocking ROS generation by NOX [119, 120]. So, RhoA activation may limit ROS production and adipogenesis while Rac1 activation may support it. However, several research groups have reported that ROS causes RhoA activation [121, 122], while Nimnual et al. demonstrated that Rac1-mediated ROS production results in the downregulation of the RhoA activity [123]. This is also required for Rac1-induced formation of membrane ruffles and integrin-mediated cell spreading. The GTPase regulation by oxidative cell status thus still remains unclear.

In line with these papers, several research groups, such as Versari et al., have found increased oxidative stress during space flight, due to microgravity [124, 125] and cosmic radiations [126]. As RhoA is decreased in microgravity, this could explain the increased production of reactive oxygen species. According to this paper, we can assume that Rac1 activities are increased in microgravity. An upregulated Rac1 activity fits well with

enhanced ROS production and improved adipogenesis.

However, a higher Rac1 activity is also consistent with a higher ability for cell migration [127, 128]. Nevertheless, results of migration in space are controversial. Bone marrow cells from rats and human embryonic brain cells show a facilitated cell migration [129, 130], while bone marrow CD34+ cells have a lower migration potential in simulated microgravity [131]. We can interpret the apparent discrepancies in migration results based on the time spent in microgravity: for short-term exposure (from minutes to hours), there are several reasons to believe that RhoA is decreased and Rac1 increased in line with their reciprocal inhibition [132], but for longer exposure (from hours to days), the Rac1-induced ROS production may increase RhoA activation [121, 122] and reduce the Rac1 activity limiting migration capabilities. The missing information in microgravity is related to the lack of measurements of specific RhoGTPase activities

RhoGTPases activities in simulated microgravity

Meyers et al. showed a reduction in active RhoA (-88% (+/-2 %)) and a decrease in phosphorylation of cofilin after 7 days in microgravity, in addition to the absence of stress fibers.

Zayzafoon et al. thus proposed a model in which the cytoskeleton is actually not the first sensor, but a secondary step affected by a gravity-sensitive sensor. In this model, it is the RhoA inactivation that is followed by cytoskeletal changes and transduction at FAs [32], which explains the alterations on MSC differentiations observed in microgravity. To our knowledge, our team is the first to perform RhoA and Rac1 assays during osteogenesis and adipogenesis in simulated microgravity using

embryonic fibroblasts. C3H10T1/2 multipotent cells were cultured in modeled microgravity using NASA's rotating wall vessels (RWV), or in control cultures under conditions of earth gravity for up to 8 days, seeded on collagen-coated microbeads (Cytodex 3, Sigma). The results presented in Fig.2 show significant decreases in both RhoA and Rac1 after long-term exposure to simulated microgravity. Regardless of the limitation of the model when it comes to simulated microgravity-related conditions, it clearly showed that downregulations of RhoA and Rac1 were compatible with enhanced adipogenesis and limited osteogenesis.

Conclusion

RhoGTPases represent a unique hub for integration of biochemical and mechanical signals. As such, they are probably very rapidly involved in a cell's adaptation to microgravity-related conditions. Published data describing this adaptation have reported on alterations of the cytoskeleton, adhesion, fibrillogenesis as well as an enhancement of the ROS production and migration that can be explained by the specific regulation of RhoGTPases. To summarize the literature, we can speculate that after a short exposure of a cell to microgravity, the RhoA activity is depressed and the Rac1 activity increased. For long-term exposure, osteogenesis has been reported to be impaired and adipogenesis promoted. These changes in multipotent cell commitment fit nicely with prolonged depressed activities of both RhoA and Rac1 (Cf. Fig.3).

Despite the critical role of RhoGTPases that we describe in this review, there is a dramatic lack of data concerning the monitoring of their activities during exposure to microgravity. These data are of crucial importance since cell adaptation is a dynamic process; we need to

use available technologies such as fused fluorescent proteins and biosensors dedicated to following RhoGTPase activities in order to decipher cell adaptation in conditions of microgravity. On ground experiments, extensive biochemical and profiling studies on mechanotransduction pathways can be performed. In an automated spaceflight, the use of biosensors specific to molecules integrating many pathways such as RhoGTPases should be presented as a simplified and integrated view of cell mechanics. The community is in need of a live imaging technology (already validated on ground [133]) that can be set up in flight conditions. We believe that groups that are successful in providing this type of integrated data will surprise our community whose thinking is limited by analysis of fixed images of cells and the monitoring of individual parameters.

As we are convinced that focal adhesion and F-actin fibers are not the primary sensors of microgravity-related signals (but rather transducers or effectors of the response), many specific GAP and GEF (respectively RhoGTPase inhibitors and stimulators) will emerge as new players in the adaptation of cells to microgravity-related conditions. What are the mechanisms that explain the activation or inhibition of these GTPases regulators? As we try to establish that mechanosensors are involved in cell adaptation to microgravity we can predict that critical players identified in these extreme conditions will in return be recognized in the mechanobiology field.

REFERENCES

1. P.J. Rijken, R.P. de Groot, W. Briegleb, W. Kruijer, A.J. Verkleij, J. Boonstra, and S.W. de Laat: "Epidermal growth factor-induced cell rounding is sensitive to simulated microgravity." *Aviat. Space Environ. Med.* vol. 62, no. 1, pp. 32–36, 1991.
2. M. Hughes-Fulford: "Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight." *Adv. Space Res. Off. J. Comm. Space Res. COSPAR.* vol. 32, no. 8, pp. 1585–1593, 2003.
3. A. Cogoli: "In Fundamentals of Space Biology: Research on Cells, Animals, and Plants in Space." *Cell Biology.* pp. 121–170. Clement G. and Slenzka K., New York (2006).
4. D. Grimm, P. Wise, M. Lebert, P. Richter, and S. Baatout: "How and why does the proteome respond to microgravity?" *Expert Rev. Proteomics.* vol. 8, no. 1, pp. 13–27, 2011.
5. R.P. de Groot, P.J. Rijken, J. Boonstra, A.J. Verkleij, S.W. de Laat, and W. Kruijer: "Epidermal growth factor-induced expression of c-fos is influenced by altered gravity conditions." *Aviat. Space Environ. Med.* vol. 62, no. 1, pp. 37–40, 1991.
6. T.G. Hammond, F.C. Lewis, T.J. Goodwin, R.M. Linnehan, D.A. Wolf, K.P. Hire, W.C. Campbell, E. Benes, K.C. O'Reilly, R.K. Globus, and J.H. Kaysen: "Gene expression in space." *Nat. Med.* vol. 5, no. 4, pp. 359, 1999.
7. Y. Liu and E. Wang: "Transcriptional analysis of normal human fibroblast responses to microgravity stress." *Genomics Proteomics Bioinformatics.* vol. 6, no. 1, pp. 29–41, 2008.
8. O. Ullrich, K. Huber, and K. Lang: "Signal transduction in cells of the immune system in microgravity." *Cell Commun. Signal. CCS.* vol. 6, pp. 9, 2008.
9. D. Ingber: "How cells (might) sense microgravity." *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* vol. 13 Suppl, pp. S3–15, 1999.
10. I.D. Pestov: "Fundamentals of Gravitational Biology." *Kosm. Biol. Med.* pp. 9 (1997).
11. M. Miyake, M. Yamasaki, A. Hazama, S. Nielsen, and T. Shimizu: "Effects of microgravity on organ development of the neonatal rat." *Uchū Seibutsu Kagaku.* vol. 18, no. 3, pp. 126–127, 2004.
12. E.C. Pollard: "Theoretical studies on living systems in the absence of mechanical stress." *J. Theor. Biol.* vol. 8, no. 1, pp. 113–123, 1965.
13. D.E. Ingber, N. Wang, and D. Stamenović: "Tensegrity, cellular biophysics, and the mechanics of living systems." *Rep. Prog. Phys. Phys. Soc. G. B.* vol. 77, no. 4, pp. 046603, 2014.
14. R.G. Bacabac, T.H. Smit, J.J.W.A. Van Loon, B.Z. Doulabi, M. Helder, and J. Klein-Nulend: "Bone cell responses to high-frequency vibration stress: does the nucleus oscillate within the cytoplasm?" *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* vol. 20, no. 7, pp. 858–864, 2006.
15. A.B. Jaffe and A. Hall: "RHO GTPASES: Biochemistry and Biology." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* vol. 21, no. 1, pp. 247–269, 2005.
16. M.G. Tairbekov: "Molekulyarnye i kletochnye osnovy gravitatsionnoi chuvstvitel'nosti (Molecular and Cellular Fundamentals of Gravitational Sensitivity)," (2002).
17. C.A. Lambert, C.M. Lapière, and B.V. Nussgens: "Biology of Adherent Cells in Microgravity." In: *Biologist, rer nat E.B.S. (ed.) Biology in Space and Life on Earth.* pp. 123–155. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2007).
18. A. Hall: "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." *Science.* vol. 279, no. 5350, pp. 509–514, 1998.
19. S. Etienne-Manneville and A. Hall: "Rho GTPases in cell biology." *Nature.* vol. 420, no. 6916, pp. 629–635, 2002.
20. A.J. Ridley and A. Hall: "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." *Cell.* vol. 70, no. 3, pp. 389–399, 1992.
21. M. Chiariello, J.P. Vaqué, P. Crespo, and J.S. Gutkind: "Activation of Ras and Rho GTPases and MAP Kinases by G-protein-coupled receptors." *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* vol. 661, pp. 137–150, 2010.
22. S. Servotte, Z. Zhang, C.A. Lambert, T.T.G. Ho, G. Chometon, B. Eckes, T. Krieg, C.M. Lapière, B.V. Nussgens, and M. Aumailley: "Establishment of stable human fibroblast cell lines constitutively expressing active Rho-GTPases." *Protoplasma.* vol. 229, no. 2,–no. 4, pp. 215–220, 2006.
23. M. Hughes-Fulford and M.L. Lewis: "Effects of microgravity on osteoblast growth activation." *Exp. Cell Res.* vol. 224, no. 1, pp. 103–109, 1996.
24. M.A. Meloni, G. Galleri, G. Pani, A. Saba, P. Pippia, and M. Cogoli-Greuter: "Space flight affects motility and cytoskeletal structures in human monocyte cell line J-111." *Cytoskelet. Hoboken NJ.* vol. 68, no. 2, pp. 125–137, 2011.
25. C. Pache, J. Kühn, K. Westphal, M.F. Toy, J.M. Parent, O. Büchi, A. Franco-Obregón, C. Depeursinge, and M. Egli: "Digital holographic microscopy real-time monitoring of cytoarchitectural alterations during simulated microgravity." *J. Biomed. Opt.* vol. 15, no. 2, pp. 026021, 2010.
26. S.I.M. Carlsson, M.T.S. Bertilaccio, E. Ballabio, and J.A.M. Maier: "Endothelial stress by gravitational unloading: effects on cell growth and cytoskeletal organization." *Biochim. Biophys. Acta.* vol. 1642, no. 3, pp. 173–179, 2003.
27. L.B. Buravkova, P.M. Gershovich, J.G. Gershovich, and A.I. Grigor'ev: "Mechanisms of gravitational sensitivity of osteogenic precursor cells." *Acta Naturae.* vol. 2, no. 1, pp. 28–36, 2010.

28. V.E. Meyers, M. Zayzafoon, S.R. Gonda, W.E. Gathings, and J.M. McDonald: "Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells." *J. Cell. Biochem.* vol. 93, no. 4, pp. 697–707, 2004.
29. F. Matsumura: "Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes." *Trends Cell Biol.* vol. 15, no. 7, pp. 371–377, 2005.
30. K. Ohashi, K. Nagata, M. Maekawa, T. Ishizaki, S. Narumiya, and K. Mizuno: "RhoAssociated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop." *J. Biol. Chem.* vol. 275, no. 5, pp. 3577–3582, 2000.
31. V.E. Meyers, M. Zayzafoon, J.T. Douglas, and J.M. McDonald: "RhoA and Cytoskeletal Disruption Mediate Reduced Osteoblastogenesis and Enhanced Adipogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells in Modeled Microgravity." *J. Bone Miner. Res.* vol. 20, no. 10, pp. 1858–1866, 2005.
32. M. Zayzafoon, V.E. Meyers, and J.M. McDonald: "Microgravity: the immune response and bone." *Immunol. Rev.* vol. 208, no. 1, pp. 267–280, 2005.
33. C.E. Walczak: "Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins." *Curr. Opin. Cell Biol.* vol. 12, no. 1, pp. 52–56, 2000.
34. F. Yang, Z. Dai, Y. Tan, and Y. Li: "Effects of Altered Gravity on the Cytoskeleton of Neonatal Rat Cardiocytes." *Microgravity Sci. Technol.* vol. 22, no. 1, pp. 45–52, 2010.
35. M.L. Lewis, J.L. Reynolds, L.A. Cubano, J.P. Hatton, B.D. Lawless, and E.H. Piepmeier: "Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat)." *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* vol. 12, no. 11, pp. 1007–1018, 1998.
36. J. Tabony, N. Rigotti, N. Glade, and S. Cortès: "Effect of weightlessness on colloidal particle transport and segregation in self-organising microtubule preparations." *Biophys. Chem.* vol. 127, no. 3, pp. 172–180, 2007.
37. C. Papaseit, N. Pochon, and J. Tabony: "Microtubule self-organization is gravity-dependent." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* vol. 97, no. 15, pp. 8364–8368, 2000.
38. H. Daub, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, A. Sobel, and A. Hall: "Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-stabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16." *J. Biol. Chem.* vol. 276, no. 3, pp. 1677–1680, 2001.
39. L. Sciola, M. Cogoli-Greuter, A. Cogoli, A. Spano, and P. Pippia: "Influence of microgravity on mitogen binding and cytoskeleton in Jurkat cells." *Adv. Space Res. Off. J. Comm. Space Res. COSPAR.* vol. 24, no. 6, pp. 801–805, 1999.
40. H. Goto, H. Kosako, and M. Inagaki: "Regulation of intermediate filament organization during cytokinesis: possible roles of RhoAssociated kinase." *Microsc. Res. Tech.* vol. 49, no. 2, pp. 173–182, 2000.
41. L. Chang and R.D. Goldman: "Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* vol. 5, no. 8, pp. 601–613, 2004.
42. B.M. Uva, M.A. Masini, M. Sturla, F. Bruzzone, M. Giuliani, G. Tagliaferro, and F. Strollo: "Microgravity-induced apoptosis in cultured glial cells." *Eur. J. Histochem. EJH.* vol. 46, no. 3, pp. 209–214, 2002.
43. C.M. Hale, A.L. Shrestha, S.B. Khatau, P.J. Stewart-Hutchinson, L. Hernandez, C.L. Stewart, D. Hodzic, and D. Wirtz: "Dysfunctional connections between the nucleus and the actin and microtubule networks in laminopathic models." *Biophys. J.* vol. 95, no. 11, pp. 5462–5475, 2008.
44. D. Michaelson, W. Abidi, D. Guardavaccaro, M. Zhou, I. Ahearn, M. Pagano, and M.R. Philips: "Rac1 accumulates in the nucleus during the G2 phase of the cell cycle and promotes cell division." *J. Cell Biol.* vol. 181, no. 3, pp. 485–496, 2008.
45. Z.Q. Dai, R. Wang, S.K. Ling, Y.M. Wan, and Y.H. Li: "Simulated microgravity inhibits the proliferation and osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells." *Cell Prolif.* vol. 40, no. 5, pp. 671–684, 2007.
46. T. Benavides Damm, A. Franco-Obregón, and M. Egli: "Gravitational force modulates G2/M phase exit in mechanically unloaded myoblasts." *Cell Cycle Georget. Tex.* vol. 12, no. 18, pp. 3001–3012, 2013.
47. L. Yuge, T. Kajiume, H. Tahara, Y. Kawahara, C. Umeda, R. Yoshimoto, S.-L. Wu, K. Yamaoka, M. Asashima, K. Kataoka, and T. Ide: "Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation." *Stem Cells Dev.* vol. 15, no. 6, pp. 921–929, 2006.
48. A. Guignandon, C. Genty, L. Vico, M.-H. Lafage-Proust, S. Palle, and C. Alexandre: "Demonstration of feasibility of automated osteoblastic line culture in space flight." *Bone.* vol. 20, no. 2, pp. 109–116, 1997.
49. N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger: "Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates." *Nat. Cell Biol.* vol. 3, no. 5, pp. 466–472, 2001.
50. N. Nabavi, A. Khandani, A. Camirand, and R.E. Harrison: "Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion." *Bone.* vol. 49, no. 5, pp. 965–974, 2011.
51. A. Guignandon, M.H. Lafage-Proust, Y. Usson, N. Laroche, A. Caillot-Augusseau, C. Alexandre, and L. Vico: "Cell cycling determines integrin-mediated adhesion in osteoblastic ROS 17/2.8 cells exposed to space-related conditions." *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* vol. 15, no. 11, pp. 2036–2038, 2001.
52. J. Gebken, B. Lüders, H. Notbohm, H.H. Klein, J. Brinckmann, P.K. Müller, and B. Bätge: "Hypergravity stimulates collagen synthesis in human osteoblast-like cells: evidence for

the involvement of p44/42 MAP-kinases (ERK 1/2)." J. Biochem. (Tokyo). vol. 126, no. 4, pp. 676–682, 1999.

53. W.A. Loesberg, X.F. Walboomers, J.J.W.A. van Loon, and J.A. Jansen: "Simulated microgravity activates MAPK pathways in fibroblasts cultured on microgrooved surface topography." Cell Motil. Cytoskeleton. vol. 65, no. 2, pp. 116–129, 2008.

54. L. Liu, C. Zong, B. Li, D. Shen, Z. Tang, J. Chen, Q. Zheng, X. Tong, C. Gao, and J. Wang: "The interaction between β 1 integrins and ERK1/2 in osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells under fluid shear stress modelled by a perfusion system." J. Tissue Eng. Regen. Med. 2012.

55. D.F. Ward Jr, W.A. Williams, N.E. Schapiro, G.L. Weber, S.R. Christy, M. Salt, R.F. Klees, A. Boskey, and G.E. Plopper: "Focal adhesion kinase signaling controls cyclic tensile strain enhanced collagen I-induced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." Mol. Cell. Biomech. MCB. vol. 4, no. 4, pp. 177–188, 2007.

56. B.M. Spiegelman and C.A. Ginty: "Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3-adipocytes." Cell. vol. 35, no. 3 Pt 2, pp. 657–666, 1983.

57. J. Liu, S.M. DeYoung, M. Zhang, M. Zhang, A. Cheng, and A.R. Saltiel: "Changes in integrin expression during adipocyte differentiation." Cell Metab. vol. 2, no. 3, pp. 165–177, 2005.

58. P. Barbe, J. Galitzky, I. De Glisezinski, D. Riviere, C. Thalarnas, J.M. Senard, F. Crampes, M. Lafontan, and M. Berlan: "Simulated Microgravity Increases β -Adrenergic Lipolysis in Human Adipose Tissue 1." J. Clin. Endocrinol. Metab. vol. 83, no. 2, pp. 619–625, 1998.

59. H. Maass, J. Transmontano, and F. Baisch: "Response of adrenergic receptors to 10 days head-down tilt bedrest." Acta Physiol. Scand. Suppl. vol. 604, pp. 61–68, 1992.

60. V.A. Convertino, J.L. Polet, K.A. Engelke, G.W. Hoffler, L.D. Lane, and C.G. Blomqvist: "Evidence for increased beta-adrenoreceptor responsiveness induced by 14 days of simulated microgravity in humans." Am. J. Physiol. vol. 273, no. 1 Pt 2, pp. R93–99, 1997.

61. J.M. Dong, T. Leung, E. Manser, and L. Lim: "cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROKalpha." J. Biol. Chem. vol. 273, no. 35, pp. 22554–22562, 1998.

62. Z. Cao, R.M. Umek, and S.L. McKnight: "Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells." Genes Dev. vol. 5, no. 9, pp. 1538–1552, 1991.

63. Q.Q. Tang, M.S. Jiang, and M.D. Lane: "Repressive effect of Sp1 on the C/EBPalpha gene promoter: role in adipocyte differentiation." Mol. Cell. Biol. vol. 19, no. 7, pp. 4855–4865, 1999.

64. J.E. Reusch, L.A. Colton, and D.J. Klemm: "CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells." Mol. Cell. Biol. vol. 20, no. 3, pp. 1008–1020, 2000.

65. A. Mettouchi, S. Klein, W. Guo, M. Lopez-Lago, E. Lemichez, J.K. Westwick, and F.G. Giancotti: "Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle." Mol. Cell. vol. 8, no. 1, pp. 115–127, 2001.

66. Q. Wan, E. Cho, H. Yokota, and S. Na: "Rac1 and Cdc42 GTPases regulate shear stress-driven β -catenin signaling in osteoblasts." Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 433, no. 4, pp. 502–507, 2013.

67. M. Hughes-Fulford and V. Gilbertson: "Osteoblast fibronectin mRNA, protein synthesis, and matrix are unchanged after exposure to microgravity." FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. vol. 13 Suppl, pp. S121–127, 1999.

68. A. Guignandon, C. Faure, T. Neutelings, A. Rattner, P. Mineur, M.-T. Linossier, N. Laroche, C. Lambert, C. Deroanne, B. Nussgens, R. Demets, A. Colige, and L. Vico: "Rac1 GTPase silencing counteracts microgravity-induced effects on osteoblastic cells." FASEB. in revision.

69. F.H. Brembeck, M. Rosário, and W. Birchmeier: "Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin." Curr. Opin. Genet. Dev. vol. 16, no. 1, pp. 51–59, 2006.

70. F.M. van Roy and P.D. McCrea: "A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer?" Nat. Rev. Cancer. vol. 5, no. 12, pp. 956–964, 2005.

71. J. Noritake, M. Fukata, K. Sato, M. Nakagawa, T. Watanabe, N. Izumi, S. Wang, Y. Fukata, and K. Kaibuchi: "Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact." Mol. Biol. Cell. vol. 15, no. 3, pp. 1065–1076, 2004.

72. M. Fukata and K. Kaibuchi: "Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion." Nat. Rev. Mol. Cell Biol. vol. 2, no. 12, pp. 887–897, 2001.

73. C.H.M. Castro, C.S. Shin, J.P. Stains, S.-L. Cheng, S. Sheikh, G. Mbalaviele, V.L. Szejnfeld, and R. Civitelli: "Targeted expression of a dominant-negative N-cadherin *in vivo* delays peak bone mass and increases adipogenesis." J. Cell Sci. vol. 117, no. Pt 13, pp. 2853–2864, 2004.

74. S.L. Ferrari, K. Traianedes, M. Thorne, M.H. Lafage-Proust, P. Genever, M.G. Cecchini, V. Behar, A. Bisello, M. Chorev, M. Rosenblatt, and L.J. Suva: "A role for N-cadherin in the development of the differentiated osteoblastic phenotype." J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. vol. 15, no. 2, pp. 198–208, 2000.

75. A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, and D.E. Discher: "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." Cell. vol. 126, no. 4, pp. 677–689, 2006.

76. F.J. Alenghat and D.E. Ingber: "Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins." Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ. vol. 2002, no. 119, pp. pe6, 2002.

77. T.P. Stein and C.E. Wade: "Metabolic consequences of muscle disuse atrophy." *J. Nutr.* vol. 135, no. 7, pp. 1824S–1828S, 2005.
78. B. Nusgens, G. Chometon, A. Guignandon, T.T.G. Ho, C. Lambert, P. Mineur, S. Servotte, Z. Zhang, C. Deroanne, B. Eckes, L. Vico, T. Krieg, M. Aumailley, and C. Lapière: "Role of the RhoGTPases in the cellular receptivity and reactivity to mechanical signals including microgravity," <http://orbi.ulg.ac.be/handle/2268/63813>.
79. Z.-G. Zhang, C.A. Lambert, S. Servotte, G. Chometon, B. Eckes, T. Krieg, C.M. Lapière, B.V. Nusgens, and M. Aumailley: "Effects of constitutively active GTPases on fibroblast behavior." *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* vol. 63, no. 1, pp. 82–91, 2006.
80. R. McBeath, D.M. Pirone, C.M. Nelson, K. Bhadriraju, and C.S. Chen: "Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment." *Dev. Cell.* vol. 6, no. 4, pp. 483–495, 2004.
81. Y.-R.V. Shih, K.-F. Tseng, H.-Y. Lai, C.-H. Lin, and O.K. Lee: "Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* vol. 26, no. 4, pp. 730–738, 2011.
82. D.L. Long, J.S. Willey, and R.F. Loeser: "Rac1 is required for matrix metalloproteinase 13 production by chondrocytes in response to fibronectin fragments." *Arthritis Rheum.* vol. 65, no. 6, pp. 1561–1568, 2013.
83. D.C. Radisky, D.D. Levy, L.E. Littlepage, H. Liu, C.M. Nelson, J.E. Fata, D. Leake, E.L. Godden, D.G. Albertson, M.A. Nieto, Z. Werb, and M.J. Bissell: "Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability." *Nature.* vol. 436, no. 7047, pp. 123–127, 2005.
84. J. Settleman: "Tension Precedes Commitment—Even for a Stem Cell." *Mol. Cell.* vol. 14, no. 2, pp. 148–150, 2004.
85. X. Yao, R. Peng, and J. Ding: "Effects of aspect ratios of stem cells on lineage commitments with and without induction media." *Biomaterials.* vol. 34, no. 4, pp. 930–939, 2013.
86. L. Gao, R. McBeath, and C.S. Chen: "Stem Cell Shape Regulates a Chondrogenic Versus Myogenic Fate Through Rac1 and N-Cadherin." *STEM CELLS.* pp. N/A–N/A, 2010.
87. R. Sordella, W. Jiang, G.-C. Chen, M. Curto, and J. Settleman: "Modulation of Rho GTPase Signaling Regulates a Switch between Adipogenesis and Myogenesis." *Cell.* vol. 113, no. 2, pp. 147–158, 2003.
88. S. Huang, C.S. Chen, and D.E. Ingber: "Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension." *Mol. Biol. Cell.* vol. 9, no. 11, pp. 3179–3193, 1998.
89. S. Huang and D.E. Ingber: "The structural and mechanical complexity of cell-growth control." *Nat. Cell Biol.* vol. 1, no. 5, pp. E131–138, 1999.
90. M.F. Olson, A. Ashworth, and A. Hall: "An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1." *Science.* vol. 269, no. 5228, pp. 1270–1272, 1995.
91. M. Yamamoto, N. Marui, T. Sakai, N. Morii, S. Kozaki, K. Ikai, S. Imamura, and S. Narumiya: "ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle." *Oncogene.* vol. 8, no. 6, pp. 1449–1455, 1993.
92. D. Joyce, B. Bouzahzah, M. Fu, C. Albanese, M. D'Amico, J. Steer, J.U. Klein, R.J. Lee, J.E. Segall, J.K. Westwick, C.J. Der, and R.G. Pestell: "Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway." *J. Biol. Chem.* vol. 274, no. 36, pp. 25245–25249, 1999.
93. J.K. Westwick, Q.T. Lambert, G.J. Clark, M. Symons, L. Van Aelst, R.G. Pestell, and C.J. Der: "Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways." *Mol. Cell. Biol.* vol. 17, no. 3, pp. 1324–1335, 1997.
94. M.L. Coleman and C.J. Marshall: "A family outing: small GTPases cyclin' through G1." *Nat. Cell Biol.* vol. 3, no. 11, pp. E250–251, 2001.
95. A.J. Ridley: "Cyclin' round the cell with Rac." *Dev. Cell.* vol. 1, no. 2, pp. 160–161, 2001.
96. J. Rosenblatt, L.P. Cramer, B. Baum, and K.M. McGee: "Myosin II-dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly." *Cell.* vol. 117, no. 3, pp. 361–372, 2004.
97. M. Glotzer: "Animal cell cytokinesis." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* vol. 17, pp. 351–386, 2001.
98. S.B. Ting, E. Deneault, K. Hope, S. Cellot, J. Chagraoui, N. Mayotte, J.F. Dorn, J.-P. Laverdure, M. Harvey, E.D. Hawkins, S.M. Russell, P.S. Maddox, N.N. Iscove, and G. Sauvageau: "Asymmetric segregation and self-renewal of hematopoietic stem and progenitor cells with endocytic Ap2a2." *Blood.* vol. 119, no. 11, pp. 2510–2522, 2012.
99. R. Nusse and H. Varmus: "Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed." *EMBO J.* vol. 31, no. 12, pp. 2670–2684, 2012.
100. L. Mellor, T. Bake, and M. Hiremath, E.G. Lobo and J.T. Oxford: "SIMULATED MICROGRAVITY AFFECTS WNT SIGNALING IN ARTICULAR CARTILAGE: POSSIBLE IMPLICATIONS FOR CROSSTALK BETWEEN CARTILAGE AND SUBCHONDRAL BONE" (2014).
101. M. Capulli, A. Rufo, A. Teti, and N. Rucci: "Global transcriptome analysis in mouse calvarial osteoblasts highlights sets of genes regulated by modeled microgravity and identifies a 'mechanoresponsive osteoblast gene signature.'" *J. Cell. Biochem.* vol. 107, no. 2, pp. 240–252, 2009.

102. Q. Wan, E. Cho, H. Yokota, and S. Na: "RhoA GTPase interacts with beta-catenin signaling in clinorotated osteoblasts." *J. Bone Miner. Metab.* vol. 31, no. 5, pp. 520–532, 2013.
103. S.J. Rodda and A.P. McMahon: "Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors." *Dev. Camb. Engl.* vol. 133, no. 16, pp. 3231–3244, 2006.
104. J.-B. Kim, P. Leucht, K. Lam, C. Luppen, D. Ten Berge, R. Nusse, and J.A. Helms: "Bone regeneration is regulated by wnt signaling." *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* vol. 22, no. 12, pp. 1913–1923, 2007.
105. D. Baksh and R.S. Tuan: "Canonical and non-canonical Wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells." *J. Cell. Physiol.* vol. 212, no. 3, pp. 817–826, 2007.
106. E.J. Arnsdorf, P. Tummala, and C.R. Jacobs: "Non-canonical Wnt signaling and N-cadherin related beta-catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate." *PLoS One.* vol. 4, no. 4, pp. e5388, 2009.
107. N. Case, M. Ma, B. Sen, Z. Xie, T.S. Gross, and J. Rubin: "Beta-catenin levels influence rapid mechanical responses in osteoblasts." *J. Biol. Chem.* vol. 283, no. 43, pp. 29196–29205, 2008.
108. A. Santos, A.D. Bakker, J.M.A. de Bleeck-Hogervorst, and J. Klein-Nulend: "WNT5A induces osteogenic differentiation of human adipose stem cells via RhoAssociated kinase ROCK." *Cytotherapy.* vol. 12, no. 7, pp. 924–932, 2010.
109. J. Rossol-Allison, L.N. Stemmler, K.I. Swenson-Fields, P. Kelly, P.E. Fields, S.J. McCall, P.J. Casey, and T.A. Fields: "Rho GTPase activity modulates Wnt3a/ β -catenin signaling." *Cell. Signal.* vol. 21, no. 11, pp. 1559–1568, 2009.
110. L. Peng, Y. Li, K. Shusterman, M. Kuehl, and C.W. Gibson: "Wnt-RhoA signaling is involved in dental enamel development." *Eur. J. Oral Sci.* vol. 119 Suppl 1, pp. 41–49, 2011.
111. M.-H. Kim, M. Kino-oka, N. Maruyama, A. Saito, Y. Sawa, and M. Taya: "Cardiomyogenic induction of human mesenchymal stem cells by altered Rho family GTPase expression on dendrimer-immobilized surface with D-glucose display." *Biomaterials.* vol. 31, no. 30, pp. 7666–7677, 2010.
112. D. Diekmann, A. Abo, C. Johnston, A.W. Segal, and A. Hall: "Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity." *Science.* vol. 265, no. 5171, pp. 531–533, 1994.
113. J.D. Lambeth: "Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases." *Curr. Opin. Hematol.* vol. 9, no. 1, pp. 11–17, 2002.
114. R. Takeya and H. Sumimoto: "Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases." *Mol. Cells.* vol. 16, no. 3, pp. 271–277, 2003.
115. M. Almeida, E. Ambrogini, L. Han, S.C. Manolagas, and R.L. Jilka: "Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton." *J. Biol. Chem.* vol. 284, no. 40, pp. 27438–27448, 2009.
116. C.-L. Kao, L.-K. Tai, S.-H. Chiou, Y.-J. Chen, K.-H. Lee, S.-J. Chou, Y.-L. Chang, C.-M. Chang, S.-J. Chen, H.-H. Ku, and H.-Y. Li: "Resveratrol promotes osteogenic differentiation and protects against dexamethasone damage in murine induced pluripotent stem cells." *Stem Cells Dev.* vol. 19, no. 2, pp. 247–258, 2010.
117. S.W. Lane, S. De Vita, K.A. Alexander, R. Karaman, M.D. Milsom, A.M. Dorrance, A. Purdon, L. Louis, M.L. Bouxsein, and D.A. Williams: "Rac signaling in osteoblastic cells is required for normal bone development but is dispensable for hematopoietic development." *Blood.* vol. 119, no. 3, pp. 736–744, 2012.
118. M.K. Kwak, K. Itoh, M. Yamamoto, T.R. Sutter, and T.W. Kensler: "Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes *in vivo* by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethiole-3-thione." *Mol. Med. Camb. Mass.* vol. 7, no. 2, pp. 135–145, 2001.
119. M.K. Cho, W.D. Kim, S.H. Ki, J.-I. Hwang, S. Choi, C.H. Lee, and S.G. Kim: "Role of G α 12 and G α 13 as Novel Switches for the Activity of Nrf2, a Key Antioxidative Transcription Factor." *Mol. Cell. Biol.* vol. 27, no. 17, pp. 6195–6208, 2007.
120. M. Dugaard, R. Nitsch, B. Razaghi, L. McDonald, A. Jarrar, S. Torrino, S. Castillo-Lliva, B. Rotblat, L. Li, A. Malliri, E. Lemichez, A. Mettouchi, J.N. Berman, J.M. Penninger, and P.H. Sorensen: "Hace1 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes." *Nat. Commun.* vol. 4, 2013.
121. A.Y. Chi, G.B. Waypa, P.T. Mungai, and P.T. Schumacker: "Prolonged hypoxia increases ROS signaling and RhoA activation in pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells." *Antioxid. Redox Signal.* vol. 12, no. 5, pp. 603–610, 2010.
122. D. Kondrikov, R.B. Caldwell, Z. Dong, and Y. Su: "Reactive oxygen species-dependent RhoA activation mediates collagen synthesis in hyperoxic lung fibrosis." *Free Radic. Biol. Med.* vol. 50, no. 11, pp. 1689–1698, 2011.
123. A.S. Nimnual, L.J. Taylor, and D. Bar-Sagi: "Redox-dependent downregulation of Rho by Rac." *Nat. Cell Biol.* vol. 5, no. 3, pp. 236–241, 2003.
124. S. Versari, G. Longinotti, L. Barenghi, J.A.M. Maier, and S. Bradamante: "The challenging environment on board the International Space Station affects endothelial cell function by triggering oxidative stress through thioredoxin interacting protein overexpression: the ESA-SPHINX experiment." *FASEB J.* vol. 27, no. 11, pp. 4466–4475, 2013.
125. T.P. Stein: "Space flight and oxidative stress." *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif.* vol. 18, no. 10, pp. 867–871, 2002.

126. I. Testard, M. Ricoul, F. Hoffschir, A. Flury-Herard, B. Dutrillaux, B. Fedorenko, V. Gerasimenko, and L. Sabatier: "Radiation-induced chromosome damage in astronauts' lymphocytes." *Int. J. Radiat. Biol.* vol. 70, no. 4, pp. 403–411, 1996.
127. M. Fukata, M. Nakagawa, and K. Kaibuchi: "Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration." *Curr. Opin. Cell Biol.* vol. 15, no. 5, pp. 590–597, 2003.
128. C.D. Lawson and K. Burridge: "The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration." *Small GTPases.* vol. 5, no. 1, 2014.
129. T. Mitsuhashi, M. Takeda, S. Yamaguchi, T. Manabe, M. Matsumoto, Y. Kawahara, L. Yuge, and K. Kurisu: "Simulated microgravity facilitates cell migration and neuroprotection after bone marrow stromal cell transplantation in spinal cord injury." *Stem Cell Res. Ther.* vol. 4, no. 2, pp. 35, 2013.
130. P.A. Plett, R. Abonour, S.M. Frankovitz, and C.M. Orschiell: "Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells." *Exp. Hematol.* vol. 32, no. 8, pp. 773–781, 2004.
131. A. Espinosa-Jeffrey, P.M. Paez, V.T. Cheli, V. Spreuer, I. Wanner, and J. de Vellis: "Impact of Simulated Microgravity on Oligodendrocyte Development: Implications for Central Nervous System Repair." *PLoS ONE.* vol. 8, no. 12, pp. e76963, 2013.
132. K. Burridge and K. Wennerberg: "Rho and Rac Take Center Stage." *Cell.* vol. 116, no. 2, pp. 167–179, 2004.
133. K. Hamamura, G. Swarnkar, N. Tanjung, E. Cho, J. Li, S. Na, and H. Yokota: "RhoA-mediated signaling in mechanotransduction of osteoblasts." *Connect. Tissue Res.* vol. 53, no. 5, pp. 398–406, 2012.
134. M. Raftopoulou and A. Hall: "Cell migration: Rho GTPases lead the way." *Dev. Biol.* vol. 265, no. 1, pp. 23–32, 2004.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1: RhoGTPase actions on the cytoskeleton and cell dynamics (modified from [134])

Integrins are necessary for translating the mechanical properties of the extracellular environment into intracellular RhoGTPase-signaling pathways. RhoA influences filopodia formation and focal adhesion assembly & maturation, in addition to controlling stress fiber formation and intracellular tension. Rac1 primarily controls actin assembly and formation of lamellipodia to ensure cell migration. Fibrillogenesis is controlled positively by RhoA and negatively by Rac1. Both RhoA and Rac1 are controlled by specific activators (GEF) and inhibitors (GAP, GDI). Cell adaptation to mechanical/gravitational challenges triggers activation of pathways integrated by RhoGTPases.

Figure 2: RhoA and Rac1 activities are downregulated after 6 days of culture in simulated microgravity conditions.

Cultures were performed with C3H10T1/2 (multipotent embryonic cells) on collagen-coated microbeads (Cytodex 3, Sigma) for adipogenic induction and on cytodex 3 beads coated with apatite minerals complexed to collagen for an osteogenic one. The adipogenic media contained 1 μ M of rosiglitazone and the osteogenic media 5 mg/mL of L-ascorbic acid, β -glycerophosphate at 10^{-3} M and retinoic acid at 10^{-5} M, in α MEM. Microbeads with cells were cultured for 2 days in 90-mm petri dishes (untreated for culture) with 10 ml of proliferation media (α MEM), after which the cells were switched 2 days in differentiated media, and finally left 6 days in a NASA rotating wall vessel (RWV). In parallel, controls were realized by culturing beads in petri dishes. RhoA and Rac1 active assays were performed with specific G-LISA kits (Cytoskeleton). The

positive controls were pure active proteins of RhoA and Rac1 provided with the kit. The results are expressed as percentage of the positive controls; show Standard Error of the Mean (SEM) of samples extracted from three independent experiments and are compared with Student's statistical t-test.

Figure 3: Proposed models describing the regulations of RhoA and Rac1 activities in space-related conditions

On Earth MSC are well spread and exhibit a tensed cytoskeleton in particular of microtubules, intermediate filaments, actin stress fibers associated with stable focal adhesions within the extracellular matrix. These elements are controlled by GTPases RhoA and Rac1. We hypothesize that during short term exposure to microgravity; RhoA might be inhibited to allow cytoskeleton reorganization in respect to the new mechanical status. Cell tension reduction might be mandatory during this adaptation. At the same time, Rac1 is activated to control peripheral actin polymerization and induces ROS production. All these events lead rapidly to a rounder cell shape with disorganization of microtubules, stress fibers, intermediate filaments and focal adhesions. Transcription may be also altered as nucleus shape is changed. In these conditions, cell is still able to migrate. When exposure to microgravity is prolonged both RhoA and Rac1 might be inhibited explaining decreases in osteogenesis & myogenesis and enhancement of adipogenesis of MSC. In addition, RhoA inhibition limits fibrillogenesis (a tension-dependent process); extracellular matrix is not properly synthesized and lost its mechanical properties appearing softer for MSC, reinforcing adipogenesis. At that time, migration is inhibited, consistent with cytoskeleton alterations and Rac1 decrease. MSC become very round, have low adhesion and may initiate anoikis.

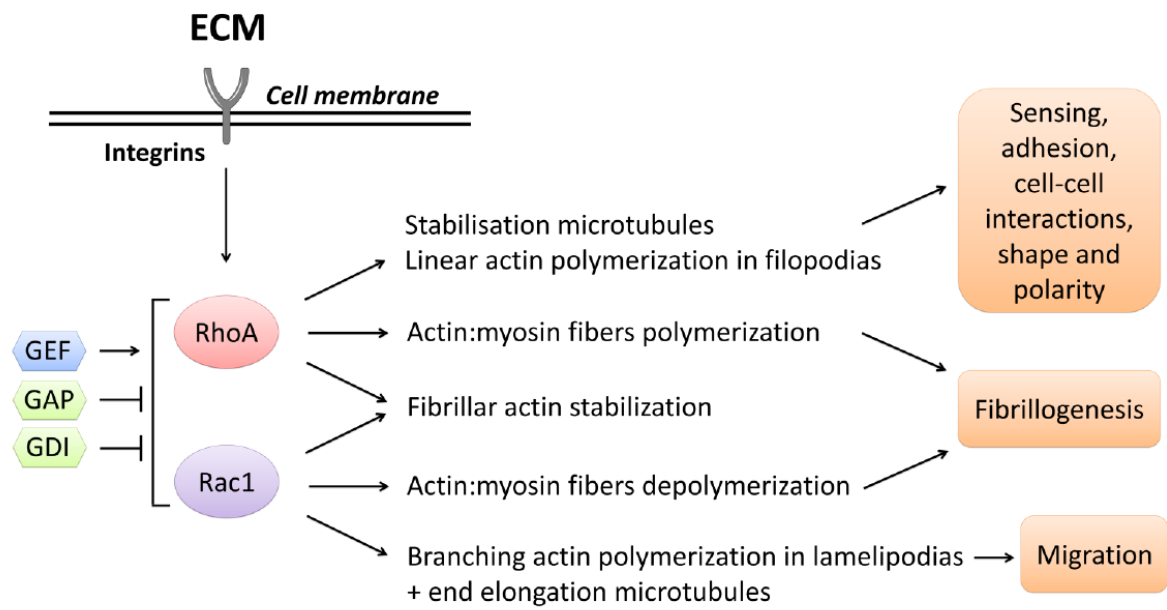


Figure 1
F. LOUIS et al.

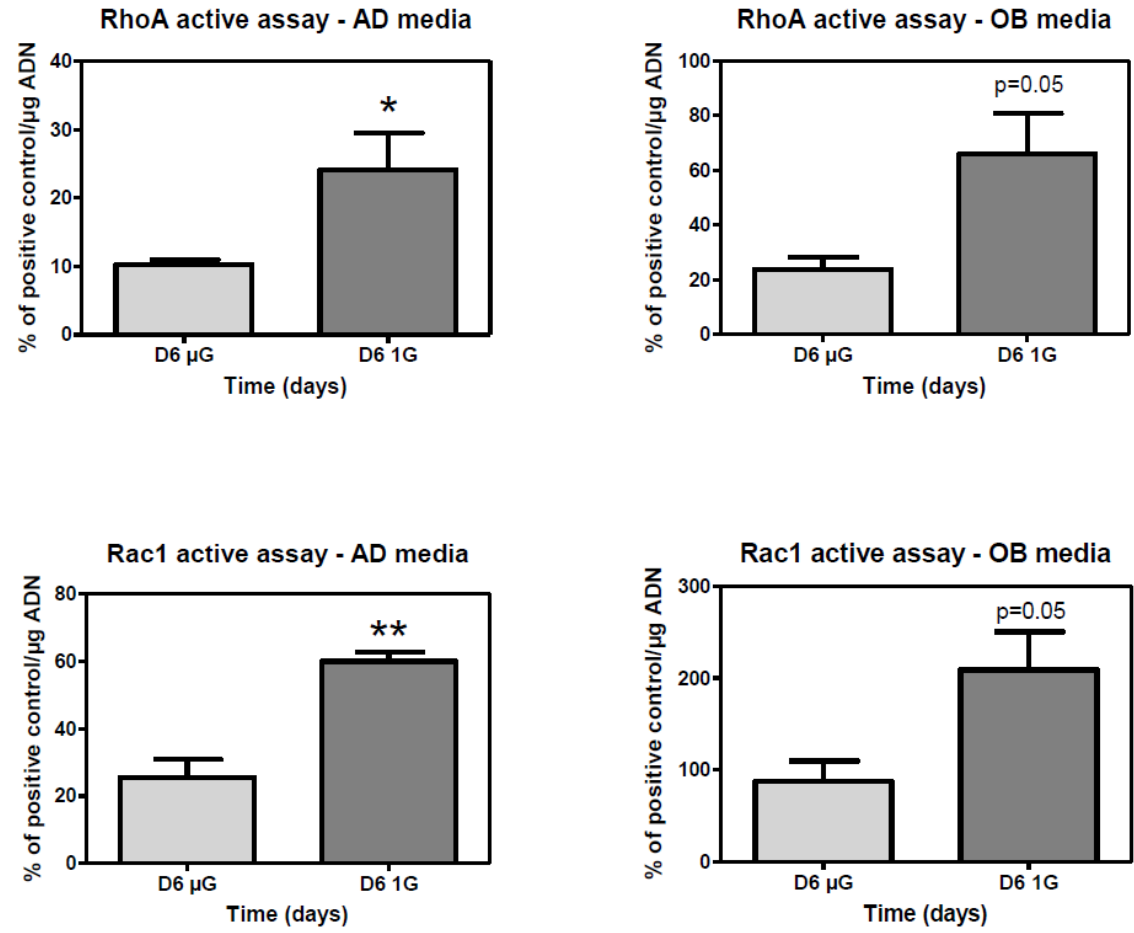


Figure 2
F. LOUIS et al.

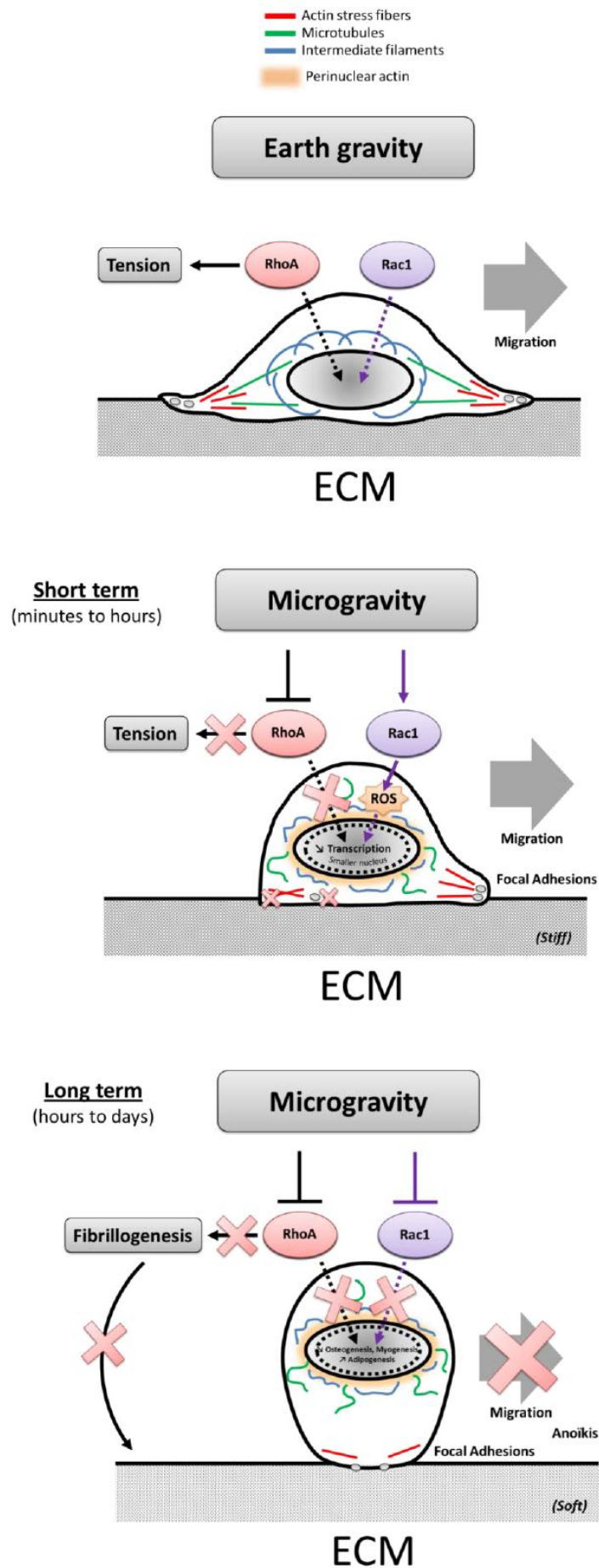


Figure 3
F. LOUIS et al.

ARTICLE 1

LA GTPASE RHOA CONTROLE L'INHIBITION DE L'ADIPOGENESE PAR LE STRONTIUM (MODELE DE CELLULES MULTIPOTENTES)

Plusieurs études montrent une induction du stress oxydatif des cellules lors des vols spatiaux. Cette production d'ERO semble liée à la fois à l'impesanteur (Versari et al. 2013; Stein 2002) ainsi qu'aux radiations cosmiques (Testard et al. 1996). Ce stress oxydatif est aussi retrouvé lors du vieillissement, et serait la conséquence du déséquilibre entre les sources de production des espèces réactives de l'oxygène et les systèmes de défense antioxydants.

Or, ces deux phénomènes, âge et impesanteur, induisent une perte osseuse, qui pour le cas de l'ostéoporose terrestre, a été montrée comme étant associée à une induction de ces marqueurs du stress oxydant et une augmentation de l'adiposité médullaire (Almeida et al. 2009). De plus, le statut oxydant des cellules souches squelettiques peut orienter leur engagement, les ERO réprimant l'ostéoblastogenèse et favorisant l'adipogenèse, alors que les molécules antioxydantes ont l'effet inverse (Santiago-Mora et al. 2011). Le strontium étant une molécule antiostéoporotique, renforçant la différenciation ostéoblastique et réprimant l'adipogenèse, nous avons alors cherché à savoir si le statut oxydant de la cellule pouvait jouer dans son l'action. D'ailleurs, ces dernières années, les ERO apparaissent aussi de plus en plus liés à la signalisation des RhoGTPases RhoA et Rac1. D'une part Rac1 est nécessaire à l'activation du complexe NOX et à la génération d'ERO (anion superoxyde, $O_2^{\cdot-}$) (Hordijk 2006), et d'autre par, les ERO peuvent agir directement sur les GTPases en modifiant des résidus cystéine spécifiques de façon covalente. La présence d'ERO au sein des cellules pourrait ainsi expliquer les différentes interactions croisées retrouvées entre RhoA et Rac1 (Sander et al. 1999; Heo 2010). Et comme les GTPases peuvent moduler l'engagement des cellules souches squelettiques, nous nous sommes demandé quelle action le strontium pourrait avoir sur le statut oxydant des cellules et sur l'activité des GTPases qui en découlent.



Submitted in Bone, ELSEVIER

Article

Small GTPase RhoA-controlled Inhibition of Adipogenesis by Strontium Chloride in a Multipotent Cell Model

C. Fournier#, F. Louis#, S. Peyroche, M. Thomas, A. Perrier, V. Dumas, A. Rattner, L. Vico, and A. Guignandon*

INSERM U1059 - Université de Lyon, Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, F42023, Saint-Etienne France

Both authors contributed equally to the conception and writing of the manuscript.

Mises au point, réalisation des expériences et rédaction du manuscrit de contributions égales.
--

* Corresponding author

Alain GUIGNANDON

INSERM U1059, LBTO

Faculté de Médecine

15 rue Ambroise PARE

F-42023 Saint-Etienne cedex 2

Email: Alain.Guignandon@univ-st-etienne.fr

Running title: RhoA controls ROS production limitation by strontium

Abstract

Age-related osteoporosis is associated with oxidative stress and characterized by a loss of bone mass as well as a rise in marrow adiposity. Reactive oxygen species (ROS) promote adipogenesis, whereas antioxidant molecules have the opposite effect since strontium chloride (Sr) is able to repress adipogenesis of multipotent mesenchymal cells (MMCs). In this study, we investigated whether Sr effects modulate the MMCs redox status modulation. Sr-treated C3H10 T1/2 cells, cultured under various adipogenic conditions, presented a drop in ROS production (down to -75%) associated with a significant PPAR γ gene repression (-50%). Induction of the antioxidant master gene Nrf2 under Sr after only one day of treatment (up to +60%) revealed that Sr could control MMC commitment through an Nrf2 pathway. As Rac1-GTPase controls ROS production and is negatively controlled by RhoA-GTPase, their specific activities under Sr were evaluated. We found that RhoA was rapidly activated under Sr treatment (+20% at day 1 and +50% at day 5) and its specific blockade demonstrated that Sr was able to sustain RhoA activity and limit ROS production. This was probably obtained by involving Nrf2, which would explain the ability of strontium to blunt adipogenesis of multipotent stem cells.

Key-words: Strontium, multipotent mesenchymal cell, PPAR γ , reactive oxygen species, RhoA, Rac1

Abbreviations

AD : Adipogenic ; Alp : Alkaline phosphatase ; ARES : Antioxidant response elements ; Bsp : Bone sialoprotein ; CaSR : Calcium sensing receptor ; CAT : Catalase ; Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog ; Cebp : CCAAT-enhancer-binding proteins ; GCLC and -GCLM : Glutamate cysteine ligase ; GSTA2 : Glutathione S-transferase 2 ; Hace1 : HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase 1 ; HO-1 : Heme oxygenase-1 ; MMC : Multipotent mesenchymal cells ; MSC : Mesenchymal stem cell ; NOX : NADPH oxidase ; NQO1 : NAD(P)H:quinone oxidoreductase ; Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 ; OB : Osteogenic ; PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ; Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 ; RhoA : Ras homolog gene family, member A ; ROS : Reactive oxygen species ; Runx2 : Runt-related transcription factor 2 ; SOD : Superoxide dismutase ; Sr : Strontium chloride

Acknowledgments

This work has received financial support from the European Space Agency, European Research In Space and Terrestrial Osteoporosis (ERISTO) contract number 14232/NL/SH (CCN3). Moreover, the study was also supported by Servier Laboratories (France).

Introduction

Strontium is an antiosteoporotic drug that reduces the risk of bone fractures in postmenopausal women with osteoporosis (Meunier et al., 2004; Reginster et al., 2005). *In vitro* and *in vivo* studies have shown that Sr favors osteoblast differentiation and inhibits osteoclastogenesis (Bonnelye et al., 2008; Marie et al., 1993). Postmenopausal osteoporosis is associated with higher bone marrow adiposity (Meunier et al., 1971) and it has previously been demonstrated that Sr inhibits adipogenesis (Fournier et al., 2012; Saidak et al., 2012). Age-related osteoporosis is also associated with an increased oxidative stress (Almeida et al., 2009), a process defined by an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and their scavenging by antioxidant defenses (Giorgio et al., 2007; Harman, 1956). In menopausal women, the loss of estrogen aggravates this phenomenon since estrogen is a powerful antioxidant (Khosla et al., 2011; Sack et al., 1994). Moreover, the oxidative status of MMCs is able to condition a preferential commitment toward the adipocyte lineage at the expense of osteoblastogenesis (Santiago-Mora et al., 2011).

Small GTP-binding proteins of the Rho family (e.g., RhoA (Ras homolog gene family, member A), Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)) are key regulators for the organization and turnover of the cytoskeleton, formation of cell–matrix adhesions, transcriptional control of gene expression, cell survival and proliferation (Jaffe and Hall, 2005). More specifically, RhoA is well characterized for its role in stress fiber formation in cells (Hall, 1998) and for controlling actin organization. RhoA

also appears to be involved in the commitment of mesenchymal stem cells (MSC) (Cristancho and Lazar, 2011; McBeath et al., 2004; Sordella et al., 2003), however the mechanism by which the RhoA activity regulates MSC differentiation has yet to be elucidated. Importantly, Rac1, another Rho-GTPase that also controls the cytoskeletal organization (Bustelo et al., 2007; Lee and Dominguez, 2010), leads to the generation of ROS. Rac1 is a cytosolic regulatory subunit of NADPH oxidase (NOX), which is a transmembrane multi-component enzyme complex (Hassanain HH, Goldschmidt-Clermont PJ., 1999) and an important ROS producer in adipocytes (Furukawa et al., 2004; Schröder et al., 2009). Adipocytes are characterized by reduced RhoA and Rac1 activities (Cristancho and Lazar, 2011; McBeath et al., 2004). An elevated Rac1 is only necessary at the beginning of adipogenesis and can be explained by the reciprocal inhibition of RhoA and Rac1. Furthermore, Sr exerts its effects at least in part through the calcium sensing receptor whose signaling pathway comprises RhoA (Fromigué et al., 2010, 2009).

To fight against the age-related ROS production, the master antioxidant factor transcription is the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2). Constitutively, Nrf2 is kept in the cytoplasm in close association with actin stress fibers and is degraded by the proteasome (Kang et al., 2004). Under oxidative stress and under intensive actin cytoskeletal remodeling, Nrf2 travels to the nucleus where it binds to a DNA promoter and initiates transcription of a huge number of phase II detoxification or antioxidant enzymes such as glutathione S-transferase 2 (GSTA2), NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1), -glutamate cysteine ligase (-GCLC and -GCLM) and heme oxygenase-1 (HO-1). Since Nrf2 degradation

is associated with actin cytoskeleton remodeling, a process modulated by RhoGTPases, it may be relevant to evaluate the action of strontium on it. Besides, Nrf2 is able to induce Haxe1 which is a negative regulator of the Rac1 activity when the latter is associated with NADPH oxidase, thus blocking ROS generation by NOX (Cho et al., 2007; Daugaard et al., 2013). Also, RhoA is involved in Nrf2 phosphorylation, which is necessary for its activation (Cho et al., 2007).

In this context, we hypothesized that Sr, by modulating the RhoGTPase activity, may prevent the commitment of MMCs toward adipogenesis. In order to further understand the anti-adipogenic action of Sr, we used mesenchymal multipotent cells (MMCs), which are able to differentiate into adipocytes. We cultured C3H10T1/2 with rosiglitazone or with an adipogenic medium and first assessed the effect of Sr on the osteoblasto-/adipo-genesis balance. To do this, we measured the lipid droplet accumulation and the expression of master genes such as *Alp* (*Alkaline phosphatase*), *Runx2* (*Runt-related transcription factor 2*), *Bsp* (*Bone sialoprotein*), *Pparγ2* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2*) and *Cebpa* (*CCAAT-enhancer-binding proteins a*) (Moerman et al., 2004). We then measured the intracellular ROS level and the gene expression of Nrf2. Finally, the RhoA and Rac1 activities following Sr treatment were assessed. By selectively blocking RhoA, we demonstrated that Sr limits ROS production mostly by activating RhoA in MMCs, followed by increasing Nrf2 gene expressions. The limitation in ROS production might finally lead to Pparγ2 and Cebpa repression and would explain the mechanisms used by Sr to limit adipogenesis.

Materials and Methods

Reagents and antibodies: αMEM, insulin, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone, strontium chloride, oil red O, trypsin-EDTA and Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) were purchased from Sigma Aldrich (St-Louis, USA). Rosiglitazone was purchased from Interchim (Montluçon, France). The RiboGreen RNA quantitation kit was purchased from Invitrogen (Life Technologies, Eugene, OR, USA). The RNeasy Plus Mini Kit was obtained from Qiagen (Courtaboeuf, France). Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green I dye was purchased from Roche Diagnostics (Meylan, France). C3 transferase-based Rho inhibitor was purchased from Tebu-bio (Le Perray-en-Yvelines, France). Methylene blue was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and glutaraldehyde from Biovalley (Conches-sur-Gondouire, France).

Cell culture: The mouse multipotent mesenchymal cell line C3H10T1/2 (clone-8; American Type Culture Collection, LGC Promochem, Molsheim, France) was maintained in T75 flasks in MEM supplemented with 10% FBS, 2-mM L-glutamine, and antibiotics (50-U/ml penicillin and 50-μg/ml streptomycin), denoted a neutral medium, in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. 5 × 10⁴ cells/well were seeded in 2 ml of the neutral medium. After 3 days of preculture, C3H10T1/2 cells were grown either in an adipogenic (AD), rosiglitazone (Rosi) or neutral medium. The AD medium consisted of complete αMEM with 1% insulin, 5×10⁻⁵ M IBMX and 10⁻⁷ M dexamethasone. The Rosi medium comprised complete αMEM with 1 μM of rosiglitazone, a potent agonist of PPARγ. The AD, Rosi or neutral medium was renewed every 2 days. A strontium chloride powder was diluted in sterile water,

then filtered, and 0 mM Sr corresponded to the vehicle. Sr or the vehicle was added in the AD or Rosi medium at each medium renewal. C3 transferase was used at 100ng/mL. After the 3 days of preculture, it was added to the neutral medium, alone for 24h and then with AD, Rosi and/or Sr up to 3 days before being removed until the 5th day.

Lipid droplet quantification assay: The cells were washed three times with PBS and then fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde (PFA). After 2 washes in PBS, the cells were put through a last wash in isopropanol 60% and let dry. Fixed dry cells were incubated with diluted Oil-Red-O (4 isopropanol: 3 water) for 10 min at room temperature. They were then washed four times in distilled water and eluted in propanol 100%. After 5 min of centrifugation at 2000g, the optical density (OD) was determined at a wavelength of 500 nm using a spectrophotometer (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation) and was normalized by methylene blue. For the methylene blue assay, after two washes in PBS, the cells were stained in methylene blue solution (HBSS + 1.25% glutaraldehyde + 0.6% methylene blue) and incubated for 1h at 37°C. They were finally washed four times in distilled water and eluted in a solution of 50% ethanol + 49% PBS + 1% acetic acid. After 15 min of agitation, the OD was determined at a wavelength of 570 nm using a spectrophotometer (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation).

RNA extraction and RT-PCR: RNA extraction and RT-PCR were performed on C3H10T1/2 cells to analyze the cell differentiation. The C3H10T1/2 cells were harvested after 3 days of preculture and 5 or 8 days in various culture media (AD or neutral). The total RNA was isolated using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA), and the RNA

quality was verified with the Experion automated electrophoresis station (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1.5 µg of total RNA with the 1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV, Roche, Hague Road, Indianapolis). For quantitative Real Time PCR, 8 µl of a cDNA mixture diluted to 1:10 in water was subjected to real-time PCR using SYBR Green I dye (Lightcycler faststart DNA master SYBR green I, Roche, Penzberg, Germany). The employed primer sequences are listed in the supplementary data section (Table 1). Values are expressed as a percentage of the housekeeping gene after normalization to cyclophilin values which did not change during the culture time under the conditions used (not shown).

Measurement of intracellular reactive oxygen species: Cell layers were washed once with cold Tris (50 mM) NaCl (0.15M) buffer (pH 7.4) and then lysed in 1% Triton X-100 TrisNaCl buffer. The samples were collected, sonicated and centrifuged at 10,000 g for 5 min at 4°C. In a black 96-well plate, 40 µl of the supernatant was mixed with 200 µl of DCFHDA (20 µM) and incubated at 37°C for 30 min. ROS levels were determined at a wavelength of 538 nm using a fluorimeter (Fluoriscan Ascent, Thermo Labsystems). ROS values were normalized to the total DNA concentration.

DNA measurement: The PicoGreen DNA quantitation kit was used to measure double-stranded DNA concentrations in solution. All reagents (dsDNA reagent, TE buffer: 200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.5 and lambda DNA standard) were obtained from the kit and the assay was performed as outlined in the protocol from the manufacturer. The data were corrected for cell-free values. Samples were placed in a black 96-well plate and excited at 485 nm. The emission was measured at 538 nm using

a fluorometer (Fluoroscanner Ascent, Thermo Labsystems).

RhoA and Rac1 assays: Levels of the active forms, i.e., GTP-RhoA and GTP-Rac1, were analyzed by assessing the RhoGTPase activity using their respective G-LISA assays (RhoA, Rac1 G-LISA Activation Assays; colorimetric format; Cytoskeleton from Tebu-Bio) following the manufacturer's protocol. The obtained values were normalized to the positive control of the kit and then to the total protein concentration, measured by the Precision Red™ Advanced Protein Assay furnished in the kit.

Statistical analysis: The obtained data were analyzed with the GraphPad Prism 5 software. The results from each group were compared using One-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls multiple comparison post hoc test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Sr as a negative modulator of adipogenesis

Massive adipogenesis of C3H10T1/2 cells occurred after 5 days of culture in adipogenic media (Rosi and AD) as visualized by the appearance of characteristic lipid droplets within the cells (**Fig 1A**). The Sr treatment drastically reduced the lipid droplet formation in the MMCs supported by significantly lower OD Oil Red O values in 3-mM Sr-treated cells as compared with the vehicle-treated group (-80% $p<0.001$, and -65% $p<0.001$ vs. AD and Rosi, respectively) (**Fig 1A and B**). As expected, under Rosi and AD conditions, *Pparγ2* and *Cebpa* mRNA levels were significantly increased, i.e., 2.5- and 4-fold, respectively ($p<0.001$ for both), whilst *Runx2* (osteoblastic master gene) was decreased by a factor of 2 ($p<0.05$). The Sr treatment blunted the AD and Rosi-induced up-regulation of the two adipogenic genes while *Runx2* and *Alp* mRNA levels were maintained under Rosi conditions. Moreover, under AD conditions, the 3-mM Sr treatment increased *Alp* and *Bsp* gene expressions as compared to the AD medium alone (+50% $p<0.001$, and +35% $p<0.01$, respectively) (**Fig 1C**).

Sr as an antioxidant molecule

The ROS level measured under these conditions reflected the balance between the ROS production and the ROS scavenging capacities. Adipogenesis of MMCs was accompanied by a rise in intracellular ROS content as compared to the neutral condition (for AD medium +70%, $p<0.001$ and for Rosi medium +25% not significant) (**Fig 2**). After 5 days of 3-mM Sr treatment, the ROS content was lower by 25% ($p<0.05$) and 75% ($p<0.001$) as compared with the Rosi and AD media alone (**Fig 2**).

Sr as an early inducer of Nrf2

After 1 day of the 3-mM Sr treatment, the *Nrf2* gene expression was increased by 45% and by 60% in the AD and Rosi media, respectively ($p < 0.05$ for both) as compared to the AD or Rosi media alone (Fig 3).

Sr as an early and persistent RhoGTPases modulator

Active GTP-RhoA and GTP-Rac1 were measured by G-Lisa (Fig 4A and B). The 3-mM Sr-treatment increased the RhoA activity by 20% ($p < 0.01$) already at day 1. This increase was maintained at day 5 (+50% vs. Rosi $p < 0.001$) and was then even more pronounced than at day 1 (+30% vs. Rosi+Sr at D1, $p < 0.001$). Concerning Rac1, it seemed to be less regulated by the Sr treatment, first moderately inhibited (-10% vs. Rosi + vehicle $p < 0.01$) and then activated by Sr (+10% vs. Rosi + vehicle $p < 0.01$).

Sr inhibits adipogenesis by a RhoA-dependent pathway

C3H10T1/2 cells were treated with C3 transferase (100ng/mL), a selective RhoA inhibitor. After 24 hours of treatment, a significant proportion of giant cells appeared (black arrows on Fig. 5A) indicating that C3 transferase treatment affected the cytoskeleton of the cell. The inhibitory action of C3 transferase on RhoA was confirmed by the reduction of RhoA activity assessed by G-Lisa (-20% vs. neutral, $p < 0.01$) (Fig. 5B). Similarly to the first experiment (Fig. 1), massive adipogenesis occurred after 5 days of Rosi treatment (Fig. 5C) and Sr dramatically reduced the lipid droplet formation in MMCs (-65%, $p < 0.001$). C3 transferase treatment precluded the inhibitory effect of Sr on adipogenesis as shown by the higher OD Oil Red O values in Rosi+C3+3mMSr cultures as compared to the Rosi+3mMSr cultures (+30%, $p < 0.01$) (Fig 5D). The C3 transferase-induced

adipogenesis in the presence of 3-mM Sr was associated with higher levels of intracellular ROS as compared with the cultures treated with Rosi+3mMSr alone (Fig 5E).

Discussion

This study has demonstrated that strontium chloride (Sr) was able to limit adipogenesis and more importantly multipotent cell commitment toward adipogenesis by selectively activating the small GTPase RhoA in rosiglitazone-treated cells. The ability of Sr to limit adipogenesis has already been described by our group (Fournier et al., 2012) and the obtained results are in accordance with those from other groups (Fromigué et al., 2010; Peng et al., 2009). However, we have here provided an original mode of action for Sr under adipogenic conditions.

Since the redox status is of crucial importance in multipotent cell commitment (Santiago-Mora et al., 2011), we monitored the ROS production in our Sr-treated cells. It was established that Sr, under adipogenic conditions, acted as an antioxidant molecule by limiting the mitochondrial-dependent ROS production as well as promoting the master antioxidant gene Nrf2. In line with these data, Sr was also demonstrated to be able to increase antioxidant enzymes like superoxide dismutase (SOD) or catalase (CAT) in ovariectomized rats (Jebahi et al., 2013) to prevent ROS-induced apoptosis of osteoblasts (Senkoylu et al., 2008) and oxidative damage in osteoporotic rat models (Yalin et al., 2012).

The Sr-induced redox modifications may thus explain its anti-adipogenic effect especially since several *in vitro* (this study) and *in vivo* studies have already shown that adipogenesis is induced by an increased ROS production (Almeida et al., 2009; Saitoh et

al., 2010) and inhibited by antioxidants (Saitoh et al., 2010; Samuni et al., 2010). A limitation of the ROS production during adipogenesis can be explained by the key antioxidant master gene Nrf2. After translocation to the nucleus, Nrf2 binds to antioxidant response elements (AREs) located in promoter regions of the target genes (Kensler et al., 2007). It is also noteworthy that PPAR γ possessed an ARE sequence in its promoter indicating that Nrf2 indirectly could control PPAR γ -dependent enzyme expression and conversely PPAR was also able to control Nrf2 induction (Kensler et al., 2007; Polvani et al., 2012). Furthermore, PPAR γ has been shown to be involved in the defensive mechanisms against oxidative stress (Okuno et al., 2008; Yoo et al., 1999). Thus, the Sr-induced repression of PPAR γ may be associated with the limited ROS production. The ability of Sr to stimulate Nrf2 expressions under both Rosi- and AD-conditions strengthens this theory. The kinetics of adipogenesis under Rosi- and AD-conditions is presumably different but the Sr-inhibiting effect on Nrf2 and PPAR γ /Cebpa is clearly similar, suggesting that Sr is a potent anti-adipogenic factor.

Nrf2 signaling is primarily dependent on its stabilization in a complex containing Keap1 and this complex is associated with the actin cytoskeleton (Kang et al., 2004). After cytoskeletal remodeling (under small RhoGTPases control), free Nrf2 can be phosphorylated (Cho et al., 2007) and translocated to the nucleus controlling the Hace1 expression (HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase 1). When Rac1 is associated with an active NOX complex (ROS generation), Hace1 triggers Rac1 proteasomal degradation, thus limiting ROS production (Cho et al., 2007; Dugaard et al., 2013). In this study, we

were unable to establish that Rac1 was the main target of Sr but RhoA was immediately activated under Sr and this activation was sustained during Sr treatment. Importantly, it is noteworthy that Nrf2 signaling is under the control of RhoA GTPase (Cho et al., 2007). In fact, active RhoA through PKC δ can phosphorylate Nrf2, suggesting that the activation of RhoA by Sr could be the initiator of the redox status modification of MMC. The link between RhoA and Nrf2 signaling and the fact that the implication of RhoA was already suggested by P Marie's group (Fromigué et al., 2010) for Sr action, prompted us to manipulate the RhoA activity. Peng et al. have also found that Sr promotes osteogenic differentiation of MSC through the Ras/MAPK signaling pathway (Peng et al., 2009), consistent with RhoA pathway implication. By using clostridial C3 exoenzyme, we established that RhoA activation was needed to limit ROS production and that its inhibition was able to restore adipogenesis under our culture conditions. This experiment suggested that the RhoA activity was able to control the ROS production in our cells but it did not rule out that the redox status modification was able to control the RhoA activity in return.

A complex interplay between ROS and GTPase activities has been documented in the literature. Nimnual et al. previously found that RhoA is inhibited by ROS, altering the Rho GTPase activity by modulating upstream Rho regulatory proteins (Nimnual et al., 2003). Moreover, Mitchell et al. showed that the RhoA activity was inhibited when cells were exogenously treated with H₂O₂ (Mitchell et al., 2013). Besides, Heo et al. (Heo et al., 2006) observed a direct RhoA activation by ROS and hypothesized that high ROS levels could inactivate RhoA due to the irreversible formation of an RhoA

Cys16/Cys20 disulfide bond. Also, RhoA/Rho-kinase was shown to induce the phosphorylation of p47 phox, a component of NADPH oxidase (Moon et al., 2013). Inactivation of NOX by RhoA might explain the ROS limitation observed under Sr.

The most described mechanism linking RhoA and adipogenesis repression can be found in the mechanotransduction field. Using MMC, Rubin's group clearly established that RhoA activation after mechanical stimulation is part of a complex signaling network controlling Akt-induced inhibition of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) with β -catenin activation (Sen et al., 2011; Thompson et al., 2013) providing a direct link to adipogenesis repression. In line with these findings, Sr might trigger cytoskeletal reorganization and an increased intracellular tension within the MMC by signaling through calcium sensing receptor (CaSR)/RhoA (Fromigué et al., 2010, 2009). A Keap1-Cullin3-Nrf2 complex formation is needed to retain Nrf2 in the cytoplasm through interactions with the actin cytoskeletal network. Nrf2 is then poised to be released from this complex when the cell senses stresses such as mechanical ones, allowing for a rapid defensive response through transcriptional activation of protective genes. We speculated that under Sr treatments, an important remodeling of the actin cytoskeleton takes place, activating first RhoA and releasing Nrf2 from the cytoskeleton thus protecting it from proteolysis. In these conditions Nrf2 might be phosphorylated by RhoA-dependent kinase and free to exert its antioxidant effects.

An important effect of Sr or Sr ranelate can be explained by the stimulation of the RhoA/Nrf2 pathway. Interestingly, Sr is known for its ability to protect osteoblastic cells from apoptosis (Senkoylu et al., 2008),

and the upregulation of Nrf2 in ROS-exposed cells or cancerous cells limits the apoptosis sensitivity (Leinonen et al., 2014). Furthermore, Sr has been extensively described for its pro-proliferative action (Caverzasio, 2008; Fournier et al., 2012) that can be directly linked to the ability of Sr to stimulate RhoA activity. Albeit beyond the scope of this paper, we can nevertheless speculate that increasing the Sr²⁺ extracellular concentration will provoke a stress for the cell, stimulating mechanosensors such as RhoA and a putative mechano-mimetic effect of Sr may explain adipogenesis repression.

To summarize, we clearly established that Sr was able to inhibit the intracellular ROS production induced during adipogenesis by activating RhoA (**Fig. 6**). Activation of RhoA after Sr treatment might increase actin cytoskeletal reorganization and Nrf2 nuclear translocation. Increased cellular tension (RhoA dependent) can be associated with sustained beta catenin signaling known to repress Ppary2 and Cebpa (**Fig. 6**). Nrf2-dependent control of anti-oxidant enzyme may explain the modification of the redox status of our MMCs and the subsequent PPAR γ gene repression. Altogether, these results identify Sr as a positive RhoA activator and thus as a potent ROS modulator. This may explain part of its actions on bone cells *in vitro* and *in vivo* as well as its clinical relevance in ageing osteoporosis (Saidak et al., 2012).

References

- Almeida, M., Ambrogini, E., Han, L., Manolagas, S.C., Jilka, R.L., 2009. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor- γ expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton. *J. Biol. Chem.* 284, 27438–27448. doi:10.1074/jbc.M109.023572
- Bonnelye, E., Chabadel, A., Saltel, F., Jurdic, P., 2008. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption *in vitro*. *Bone* 42, 129–138. doi:10.1016/j.bone.2007.08.043
- Bustelo, X.R., Sauzeau, V., Berenjeno, I.M., 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions *in vivo*. *BioEssays* 29, 356–370. doi:10.1002/bies.20558
- Caverzasio, J., 2008. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. *Bone* 42, 1131–1136. doi:10.1016/j.bone.2008.02.010
- Cho, M.K., Kim, W.D., Ki, S.H., Hwang, J.-I., Choi, S., Lee, C.H., Kim, S.G., 2007. Role of $G\alpha 12$ and $G\alpha 13$ as Novel Switches for the Activity of Nrf2, a Key Antioxidative Transcription Factor. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6195–6208. doi:10.1128/MCB.02065-06
- Cristancho, A.G., Lazar, M.A., 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 722–734. doi:10.1038/nrm3198
- Daugaard, M., Nitsch, R., Razaghi, B., McDonald, L., Jarrar, A., Torrino, S., Castillo-Lluva, S., Rotblat, B., Li, L., Malliri, A., Lemichez, E., Mettouchi, A., Berman, J.N., Penninger, J.M., Sorensen, P.H., 2013. Haxe1 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes. *Nat. Commun.* 4. doi:10.1038/ncomms3180
- Fournier, C., Perrier, A., Thomas, M., Laroche, N., Dumas, V., Rattner, A., Vico, L., Guignandon, A., 2012. Reduction by strontium of the bone marrow adiposity in mice and repression of the adipogenic commitment of multipotent C3H10T1/2 cells. *Bone* 50, 499–509. doi:10.1016/j.bone.2011.07.038
- Fromigué, O., Haÿ, E., Barbara, A., Marie, P.J., 2010. Essential Role of Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT)-mediated Wnt Signaling in Osteoblast Differentiation Induced by Strontium Ranelate. *J. Biol. Chem.* 285, 25251–25258. doi:10.1074/jbc.M110.110502
- Fromigué, O., Haÿ, E., Barbara, A., Petrel, C., Traiffort, E., Ruat, M., Marie, P.J., 2009. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 2189–2199. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00673.x
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I., 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114, 1752–1761. doi:10.1172/JCI21625
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., Pelicci, P.G., 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 722–728. doi:10.1038/nrm2240
- Hall, A., 1998. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science* 280, 2074–2075.
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Hassanain HH, Goldschmidt-Clermont PJ., 1999. Rac, superoxide and signal transduction., in: Antioxidant and Redox Regulation of Genes. Sen CK, Sies H, Baeuerle PA, editors. San Diego, CA: Academic, p. chapt. 3, p. 47–79.
- Heo, J., Raines, K.W., Mocanu, V., Campbell, S.L., 2006. Redox Regulation of RhoA. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 14481–14489. doi:10.1021/bi0610101
- Jaffe, A.B., Hall, A., 2005. RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247–269. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721
- Jebahi, S., Oudadesse, H., Jardak, N., Khayat, I., Keskes, H., Khabir, A., Rebai, T., El Feki, H., El Feki, A., 2013. Biological therapy of strontium-substituted bioglass for soft tissue wound-healing: Responses to oxidative stress in ovariectomised rats. *Ann. Pharm. Fr.* 71, 234–242. doi:10.1016/j.pharma.2013.05.003
- Kang, M.-I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.-G., Yamamoto, M., 2004. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2046–2051. doi:10.1073/pnas.0308347100
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N., Biswal, S., 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 89–116. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046
- Khosla, S., Melton, L.J., 3rd, Riggs, B.L., 2011. The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed? *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 26, 441–451. doi:10.1002/jbmr.262
- Lee, S.H., Dominguez, R., 2010. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol. Cells* 29, 311–325.
- Leinonen, H.M., Kansanen, E., Pölönen, P., Heinäniemi, M., Levonen, A.-L., 2014. Role of the keap1-nrf2 pathway in cancer. *Adv. Cancer Res.* 122, 281–320. doi:10.1016/B978-0-12-420117-0.00008-6

Article 1

- Marie, P.J., Hott, M., Modrowski, D., De Pollak, C., Guillemain, J., Deloffre, P., Tsouderos, Y., 1993. An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 8, 607–615. doi:10.1002/jbmr.5650080512
- McBeath, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K., Chen, C.S., 2004. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* 6, 483–495.
- Meunier, P., Aaron, J., Edouard, C., Vignon, G., 1971. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin. Orthop.* 80, 147–154.
- Meunier, P.J., Roux, C., Seeman, E., Ortolani, S., Badurski, J.E., Spector, T.D., Cannata, J., Balogh, A., Lemmel, E.-M., Pors-Nielsen, S., Rizzoli, R., Genant, H.K., Reginster, J.-Y., 2004. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 350, 459–468. doi:10.1056/NEJMoa022436
- Mitchell, L., Hobbs, G.A., Aghajanian, A., Campbell, S.L., 2013. Redox Regulation of Ras and Rho GTPases: Mechanism and Function. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 250–258. doi:10.1089/ars.2012.4687
- Moerman, E.J., Teng, K., Lipschitz, D.A., Lecka-Czernik, B., 2004. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell* 3, 379–389. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00127.x
- Moon, M.-Y., Kim, H.-J., Li, Y., Kim, J.-G., Jeon, Y.-J., Won, H.-Y., Kim, J.-S., Kwon, H.-Y., Choi, I.-G., Ro, E., Joe, E.-H., Choe, M., Kwon, H.-J., Kim, H.-C., Kim, Y.-S., Park, J.-B., 2013. Involvement of small GTPase RhoA in the regulation of superoxide production in BV2 cells in response to fibrillar Aβ peptides. *Cell. Signal.* 25, 1861–1869. doi:10.1016/j.cellsig.2013.05.023
- Nimnual, A.S., Taylor, L.J., Bar-Sagi, D., 2003. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* 5, 236–241. doi:10.1038/ncb938
- Okuno, Y., Matsuda, M., Kobayashi, H., Morita, K., Suzuki, E., Fukuhara, A., Komuro, R., Shimabukuro, M., Shimomura, I., 2008. Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPARgamma-responsive region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 698–704. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.001
- Peng, S., Zhou, G., Luk, K.D.K., Cheung, K.M.C., Li, Z., Lam, W.M., Zhou, Z., Lu, W.W., 2009. Strontium Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Through the Ras/MAPK Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* 23, 165–174. doi:10.1159/000204105
- Polvani, S., Tarocchi, M., Galli, A., 2012. PPARγ and Oxidative Stress: Con(b) Catenating NRF2 and FOXO. *PPAR Res.* 2012, e641087. doi:10.1155/2012/641087
- Reginster, J.Y., Seeman, E., De Vernejoul, M.C., Adami, S., Compston, J., Phenekos, C., Devogelaer, J.P., Curiel, M.D., Sawicki, A., Goemaere, S., Sorensen, O.H., Felsenberg, D., Meunier, P.J., 2005. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 2816–2822. doi:10.1210/jc.2004-1774
- Sack, M.N., Rader, D.J., Cannon, R.O., 3rd, 1994. Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* 343, 269–270.
- Saidak, Z., Haÿ, E., Marty, C., Barbara, A., Marie, P.J., 2012. Strontium ranelate rebalances bone marrow adipogenesis and osteoblastogenesis in senescent osteopenic mice through NFATc/Maf and Wnt signaling. *Aging Cell* 11, 467–474. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00804.x
- Saitoh, Y., Xiao, L., Mizuno, H., Kato, S., Aoshima, H., Taira, H., Kokubo, K., Miwa, N., 2010. Novel polyhydroxylated fullerene suppresses intracellular oxidative stress together with repression of intracellular lipid accumulation during the differentiation of OP9 preadipocytes into adipocytes. *Free Radic. Res.* 44, 1072–1081. doi:10.3109/10715762.2010.499905
- Samuni, Y., Cook, J.A., Choudhuri, R., Degraff, W., Sowers, A.L., Krishna, M.C., Mitchell, J.B., 2010. Inhibition of adipogenesis by Tempol in 3T3-L1 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 667–673. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.028
- Santiago-Mora, R., Casado-Díaz, A., De Castro, M.D., Quesada-Gómez, J.M., 2011. Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 22, 675–684. doi:10.1007/s00198-010-1270-x
- Schröder, K., Wandzioch, K., Helmcke, I., Brandes, R.P., 2009. Nox4 acts as a switch between differentiation and proliferation in preadipocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 239–245. doi:10.1161/ATVBAHA.108.174219
- Sen, B., Guilly, C., Xie, Z., Case, N., Styner, M., Thomas, J., Oguz, I., Rubin, C., Burrige, K., Rubin, J., 2011. Mechanically induced focal adhesion assembly amplifies anti-adipogenic pathways in mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 29, 1829–1836. doi:10.1002/stem.732
- Senkoylu, A., Yilmaz, A., Ergun, M.A., İlhan, M.N., Simsek, A., Altun, N., Bolukbasi, S., Menevse, S., 2008. Effect of Strontium Ranelate on Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis of CRL-11372 Cells. *Biochem. Genet.* 46, 197–205. doi:10.1007/s10528-008-9142-1

Article 1

Sordella, R., Jiang, W., Chen, G.-C., Curto, M., Settleman, J., 2003. Modulation of Rho GTPase Signaling Regulates a Switch between Adipogenesis and Myogenesis. *Cell* 113, 147–158. doi:10.1016/S0092-8674(03)00271-X

Thompson, W.R., Guilluy, C., Xie, Z., Sen, B., Brobst, K.E., Yen, S.S., Uzer, G., Styner, M., Case, N., Burridge, K., Rubin, J., 2013. Mechanically Activated Fyn Utilizes mTORC2 to Regulate RhoA and Adipogenesis in Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* N/A–N/A. doi:10.1002/stem.1476

Yalin, S., Sagır, O., Comelekoglu, U., Berköz, M., Eroglu, P., 2012. Strontium ranelate treatment improves oxidative damage in osteoporotic rat model. *Pharmacol. Rep. PR* 64, 396–402.

Yoo, H.Y., Chang, M.S., Rho, H.M., 1999. Induction of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid. *Gene* 234, 87–91.

Figure legends

Figure 1: Sr as a negative modulator of adipogenesis and the production of reactive oxygen species.

Cells were cultured 5 days in AD medium or Rosiglitazone (Rosi) with 0 or 3-mM Sr (A) and harvested for lipid droplets assays (B), gene expression analysis (C) and ROS level assessment by DCFHDA (D). mRNA and ROS assays are represented as a percentage of the neutral medium with 0-mM Sr (horizontal bar at 100%). Error bars represent s.e.m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with neutral medium with 0-mM Sr (N = 6).

Figure 2: Sr as a negative modulator of reactive oxygen species production.

Cells were cultured for 5 days in AD or Rosiglitazone (Rosi) media with 0- or 3-mM Sr (A) and harvested for ROS level assessment by DCFHDA (D). Values are represented as a percentage of the neutral medium with 0-mM Sr (horizontal bar at 100%). Error bars represent s.e.m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with neutral medium with 0-mM Sr (N = 6).

Figure 3: Sr as an inducer of antioxidant enzymes

C3H10T1/2 cells were cultured for 1 day in Rosiglitazone (Rosi) or AD media with 0- or 3-mM Sr. Cells were then harvested for gene expression analysis of Nrf2. Error bars represent s.e.m. * $p < 0.05$ compared with Rosi medium (N = 6).

Figure 4: Sr as an inducer of the RhoGTPase RhoA.

C3H10T1/2 cells were cultured for 1 and 5 days in Rosiglitazone (Rosi) with 0- or 3-mM Sr. Cells were then harvested for G-LISA assays of RhoA

(A) and Rac1 (B). Error bars represent s.e.m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with Rosi medium at day 1 (N = 4).

Figure 5: Sr inhibits adipogenesis by RhoA induction.

C3H10T1/2 were cultured for 24h with C3 at 100 ng/mL in a neutral medium (A). The black arrows show cell cytoskeleton deformation induced by RhoA inhibition leading to giant cells. The inhibitory action of C3 transferase on RhoA was confirmed by the reduction of the RhoA activity assessed by a G-LISA assay after 24h (B), ** $p < 0.01$ compared with neutral medium without C3 transferase (N=4).

C3H10T1/2 cells were then cultured for 5 days in Rosiglitazone (Rosi) with 0- or 3-mM Sr and with or without C3 transferase (C). The C3 transferase treatment precluded the inhibitory effect of Sr on adipogenesis as shown by the higher values of lipid droplet quantification (D), or intracellular ROS levels (E), in Rosi+C3+3mMSr cultures as compared with the Rosi+3mMSr cultures (D), ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ (N=4).

Figure 6: Putative mode of action of Sr on multipotent cell C3H10T1/2.

Sr inhibits the intracellular ROS production induced during adipogenesis by activating the small RhoGTPase (RhoA). Activation of RhoA after Sr treatment might increase actin cytoskeletal reorganization and Nrf2 nuclear translocation. Increased cellular tension (RhoA-dependent process) after activation of cytoskeleton remodeling could be associated with a sustained beta catenin signaling known to repress *Ppar γ 2* and *Cebpa* (Adipogenic master genes). Nrf2-dependent control of numerous anti-oxidant enzymes may explain the modification of redox status of our MMCs and further *PPAR γ* gene repression.

Table 1 : Oligonucleotide sequences used in real time RT-PCR

Target genes (mouse)		
PPARγ	Forward	5' - GAAATTACCATGGTTGACACAGAG - 3'
	Reverse	5' - GTGAATGGAATGTCTTCATAGTG - 3'
CEBPα	Forward	5' - CAAGCCAGGACTAGGAGATT - 3'
	Reverse	5' - CCAAGGCACAAGGTTACTTC - 3'
Runx2	Forward	5' - CCGGGAATGATGAGAACTAC - 3'
	Reverse	5' - TGTCTGTGCCTTCTTGGTTC - 3'
ALP	Forward	5' - CCAACTCTTTTGTCAGAGA - 3'
	Reverse	5' - GGCTACATTGGTGTGAGCTTTT - 3'
BSP	Forward	5' - ACAATCCGTGCCACTCACTC - 3'
	Reverse	5' - GGAAGTATCGCCGTCTCCAT - 3'
Cyclophilin	Forward	5' - GGTGACTTTACAGCCATAATG - 3'
	Reverse	5' - GGCTCCACAATGTCATGCC - 3'

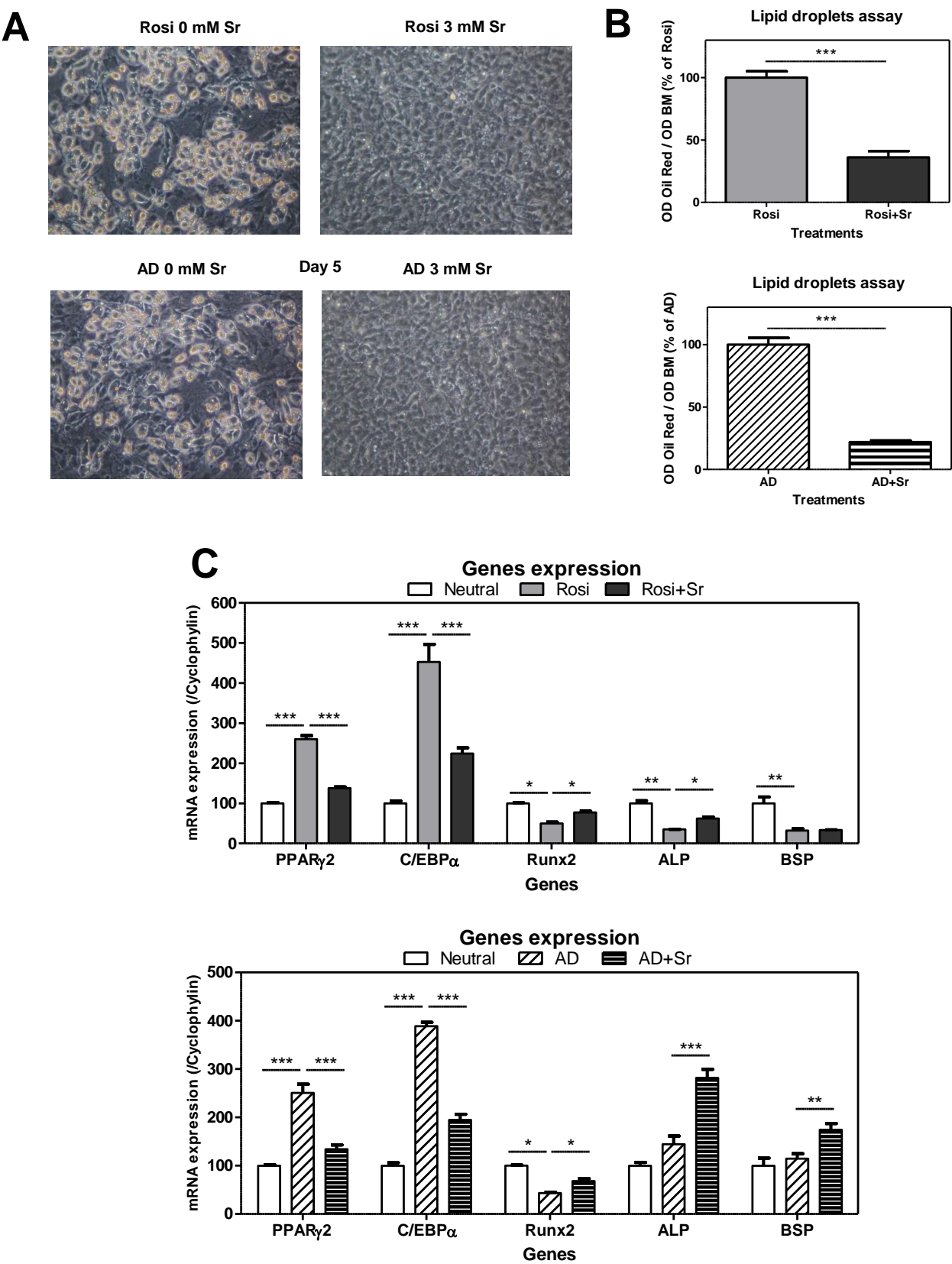


Figure 1, Fournier *et al.*

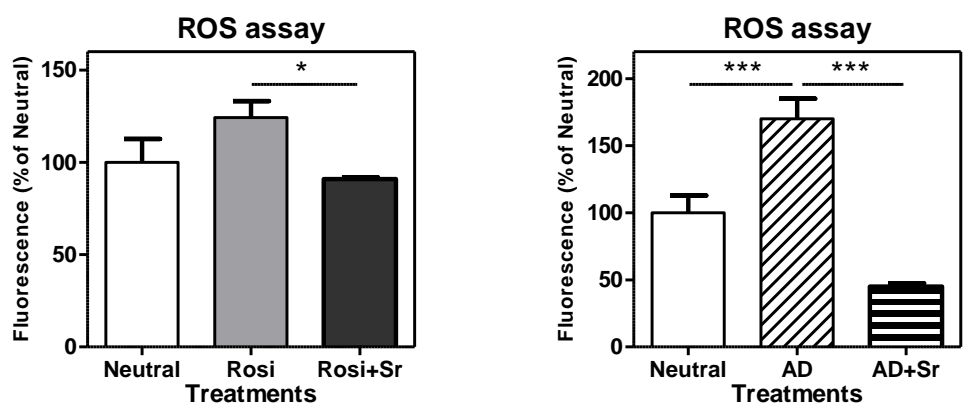


Figure 2, Fournier *et al.*

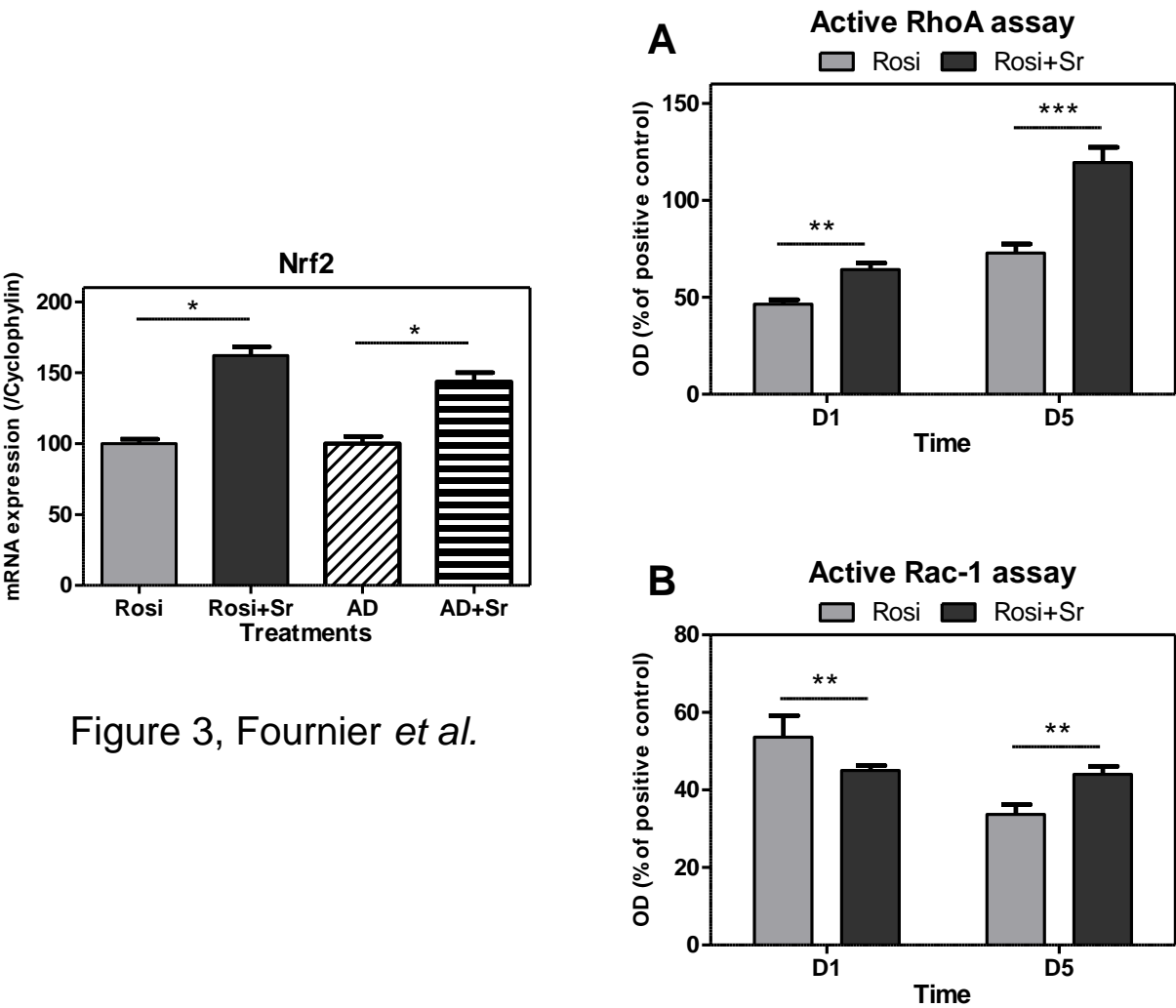


Figure 3, Fournier *et al.*

Figure 4, Fournier *et al.*

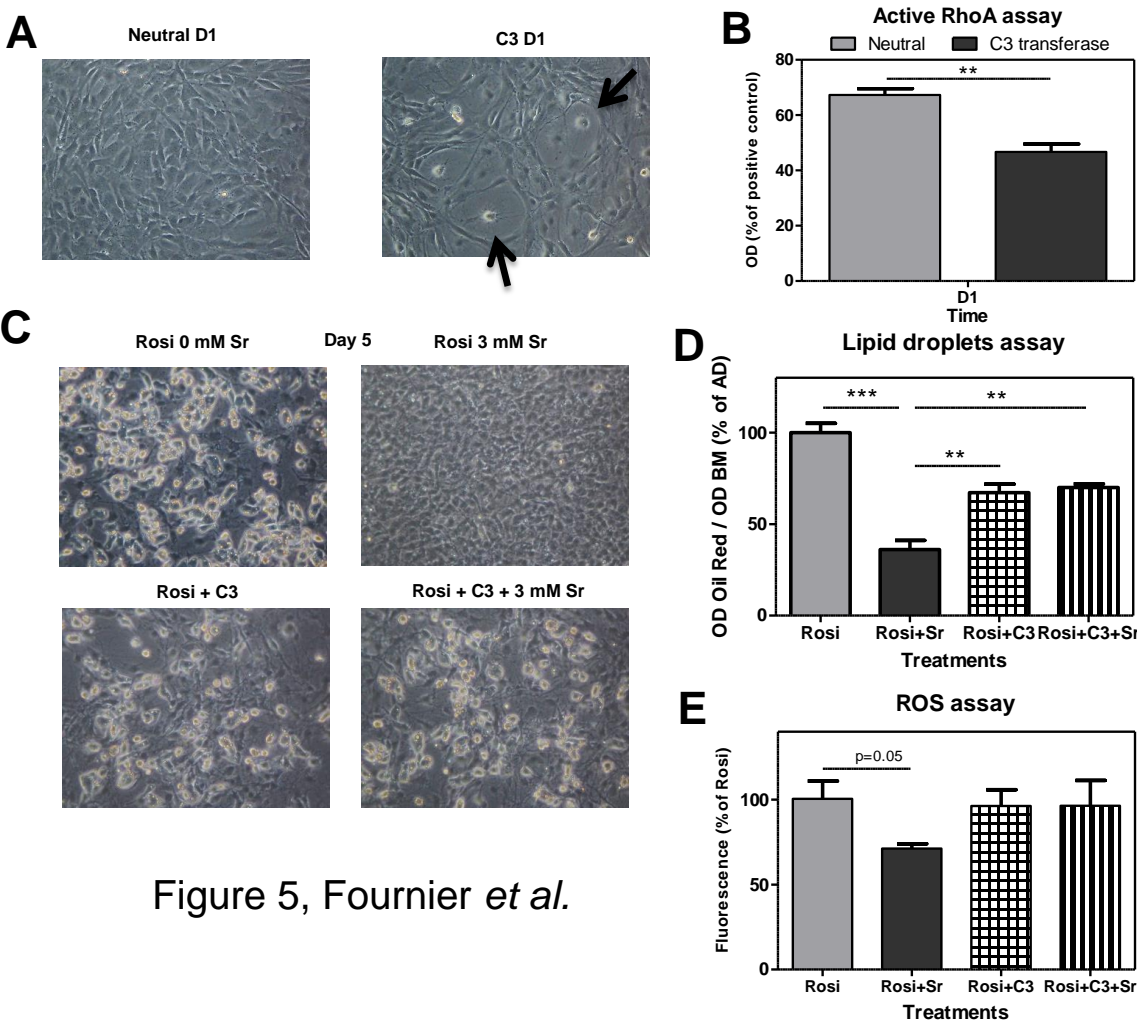


Figure 5, Fournier *et al.*

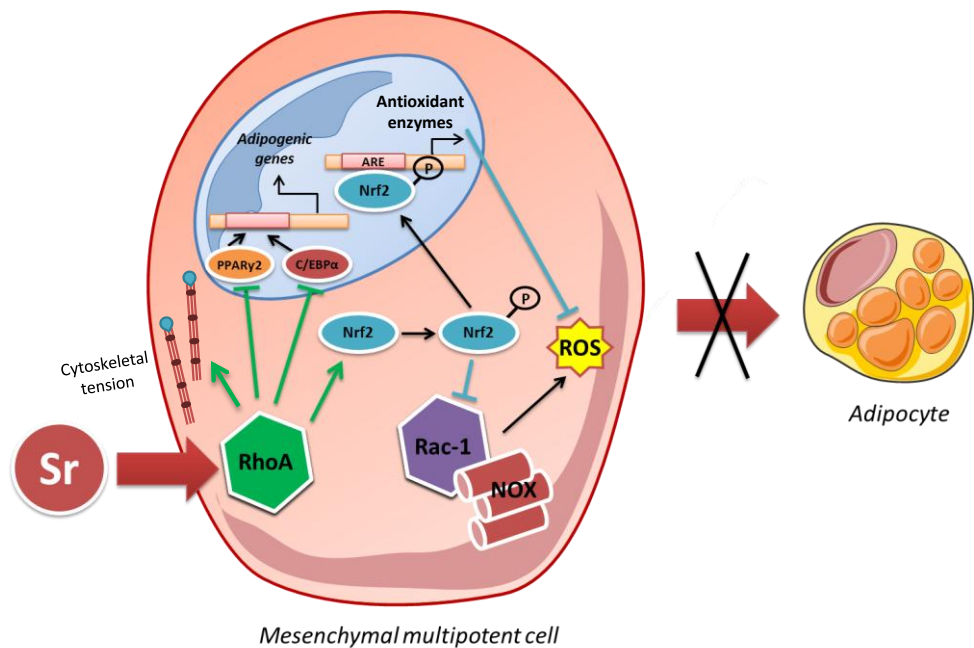


Figure 6, Fournier *et al.*

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

1. LES DECOUPLEURS DE LA MITOCHONDRIE : PGC-1A ET UCP1

Il est admis depuis longtemps que l'activité de la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP sont liées. Le fonctionnement en est simple : les composants de la chaîne expulsent les protons lorsqu'ils réoxydent des coenzymes provenant du cycle de Krebs (NADH, FADH₂). Ce gradient de protons est consommé par l'ATP synthase. Ainsi, théoriquement toute fuite de protons qui ne passerait pas par l'ATP synthase conduira à un découplage entre la respiration et la production d'énergie par la mitochondrie. L'exemple de découplage le plus connu à ce jour est celui induit par la protéine UCP1 présente plutôt dans le tissu adipeux brun. En facilitant le retour des protons dans la matrice mitochondriale, UCP1 découple le fonctionnement de la chaîne respiratoire de la synthèse d'ATP. L'énergie issue de l'oxydation des substrats n'est plus convertie sous forme d'ATP mais dissipée sous forme de chaleur et alimente en calories les vaisseaux sanguins qui le longent, participant ainsi à la thermorégulation de l'animal. Lorsque cette découverte a été effectuée, les chercheurs pensaient avoir mis la main sur une protéine qui aurait pu endiguer l'obésité dans le monde. Malheureusement, UCP1 n'est surtout présente que dans le tissu adipeux brun, qui disparaît chez l'homme rapidement après la naissance (Rousset et al. 2004), et un peu dans le tissu adipeux beige.

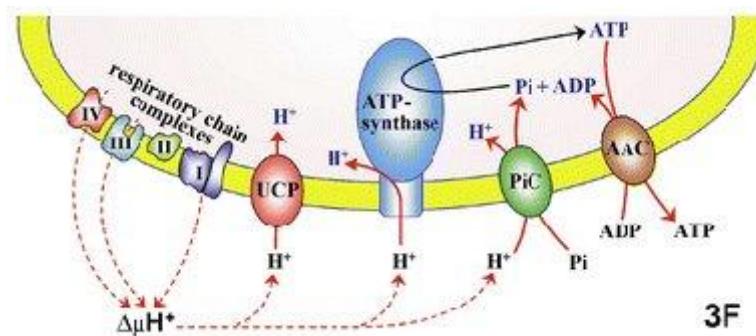


FIGURE 55 : LE DECOUPLAGE DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE PAR LA PROTEINE UCP1 (ADJEITEY ET AL. 2013)

UCP1 est tout de même indispensable, car elle participe à la protection de l'organisme vis à vis des espèces réactives de l'oxygène naturellement produites dans la mitochondrie (Adjeitey et al. 2013). La production des ERO associée à la respiration de l'oxygène est limitée par le découplage réalisé par UCP1 et la baisse du potentiel électrochimique qui en découle (puisque les H⁺ rentrent plus facilement dans la matrice mitochondriale)(Figure 55). Ainsi, UCP1 a été montré comme contrôlant la production des ERO en limitant les ions superoxydes (O₂^{•-}) (Keipert et al. 2010).

L'activité d'UCP1 passe par PGC-1α, identifié comme co-activateur de PPARγ. C'est une protéine nucléaire qui permet, en fonction du promoteur, de co-activer l'expression de certains gènes, notamment UCP1 ou NRF2 (Figure 56) (Tiraby et al. 2003). L'expression de PGC-1α est donc liée au métabolisme énergétique et permet aussi la phosphorylation oxydative (synthèse d'ATP entre autres).

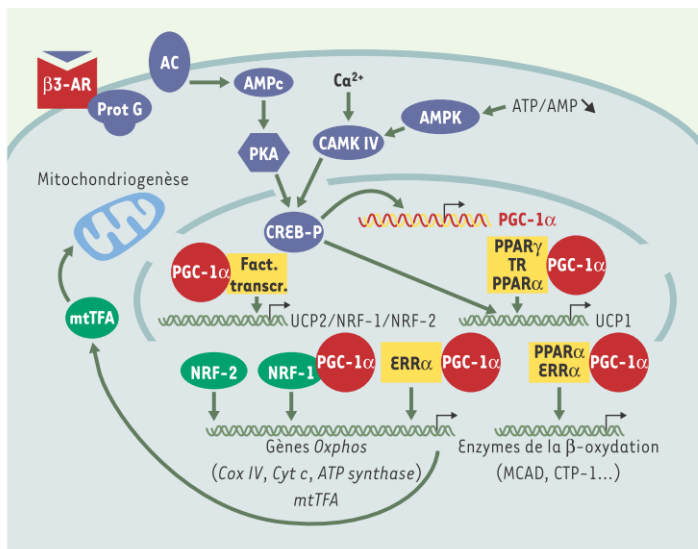


FIGURE 56 : PGC-1A PERMET L'EXPRESSION DES GENES ANTIOXYDANTS (NRF2, ETC...)
(Tiraby et Langin 2005)

Des cellules surexprimant PGC-1 α montrent une diminution de l'accumulation des EROj induisent leurs enzymes antioxydantes, et réduisent leur mort cellulaire par apoptose en cas de stress oxydant (Valle et al. 2005; Marmolino et al. 2010; Fujisawa et al. 2009). A l'inverse, la sous expression de PGC-1 α réduit l'expression génique des enzymes antioxydantes (SOD1, SOD2, CAT et GPX1) dans des cellules C310T1/2 (St-Pierre et al. 2006).

2. THERMOGENESE ET OS

En vue des différents tissus adipeux existant et sachant que les adipocytes médullaires ont un phénotype intermédiaire entre les adipocytes blancs et bruns, nous nous sommes demandé si le strontium pouvait avoir un impact dans la transdifférenciation de ces adipocytes, l'hypothèse étant de vérifier s'il ne permettait pas de les faire se différencier en adipocytes plutôt bruns ou beige.

Quel en serait l'intérêt pour l'os *in vivo* ?

Le remodelage de l'os est réalisé en réponse à des signaux physiques ou hormonaux, mais requiert un certain niveau d'énergie. Les adipocytes bruns sont connus pour leur activité de thermogénèse, activité aussi décrite en ce qui concerne la moelle osseuse et sa réponse aux faibles températures (Jeffrey M. Gimble et Nuttall 2004). En fait, la distribution de la graisse médullaire dans les régions trabéculaires distales par exemple, concerne un os naturellement exposé à de faibles températures, d'où le rôle des adipocytes jaune dans l'activité thermogénique (Lecka-Czernik 2012). Ainsi, il semble exister un lien entre adipocytes bruns et os, des souris sans tissu adipeux brun ayant une masse osseuse très basse. Les adipocytes de la moelle forment un réservoir d'énergie pour les situations d'urgence, dont la réparation des fractures osseuses par exemple. En effet, la température du squelette appendiculaire notamment, montre en moyenne 3 à 4 degrés de moins que la cavité abdominale. Les adipocytes jaunes/beiges/bruns serviraient donc à augmenter la température lors de la formation des os. Car la chaleur c'est aussi de l'énergie, donc les adipocytes vont chercher à recruter les vaisseaux sanguins, les chondrocytes, les ostéoblastes sur les sites de formation osseuse afin de leur fournir de l'énergie par la chaleur, qui sera ensuite dissipée dans le réseau sanguin (Motyl et Rosen 2011). Ainsi, la leptine ou l'adiponectine sécrétée par les adipocytes servent à activer les signaux hypothalamiques, afin de réguler la température du corps, mais aussi le remodelage osseux. De même, des ostéoblastes mis en contact avec de l'insuline vont recruter les ostéoclastes. Les adipokines sécrétées par les adipocytes auront tendance à inhiber l'ostéoblastogénèse et à induire l'ostéoclastogénèse (Motyl et Rosen 2011; Krings et al. 2012).

Ces adipocytes de la moelle osseuse pourraient donc participer à la dissipation de l'énergie. L'expression de gènes intervenant dans la dissipation de l'énergie (comme $\beta 3AR$ and UCP1), typiques des cellules adipeuses brunes, y a été retrouvée, alors qu'ils sont absents dans le tissu adipeux blanc (Krings et al. 2012). Par contre, les adipocytes jaunes sont peu efficaces dans la production d'énergie, en particulier avec l'âge. Cette production d'énergie à partir des acides gras se produit dans les mitochondries. Avec l'âge, l'expression de certains gènes, associés à une réduction de la fonction mitochondriale comme le TNF α (Facteur de nécrose tumorale α), le p53, le BCL2L11 (protéine 11 de type BCL-2 (B-cell lymphoma 2)) ou l'IL-1 β (Interleukine 1 β), a été retrouvée de manière significativement plus importante dans les adipocytes jaunes que dans ceux de la graisse blanche de l'épididyme (L.-F. Liu et al. 2011).

Cette hypothèse expliquerait aussi la perte osseuse liée à l'âge en parallèle à une diminution des adipocytes bruns et de la thermogénèse. De plus, une réduction de l'expression de protéines participant à l'oxydation des acides gras et à la réponse thermogénique à la stimulation adrénergique, suggère qu'avec le vieillissement, le phénotype des adipocytes de la moelle jaune se modifie pour devenir encore moins efficace dans la production d'énergie (Krings et al. 2012).

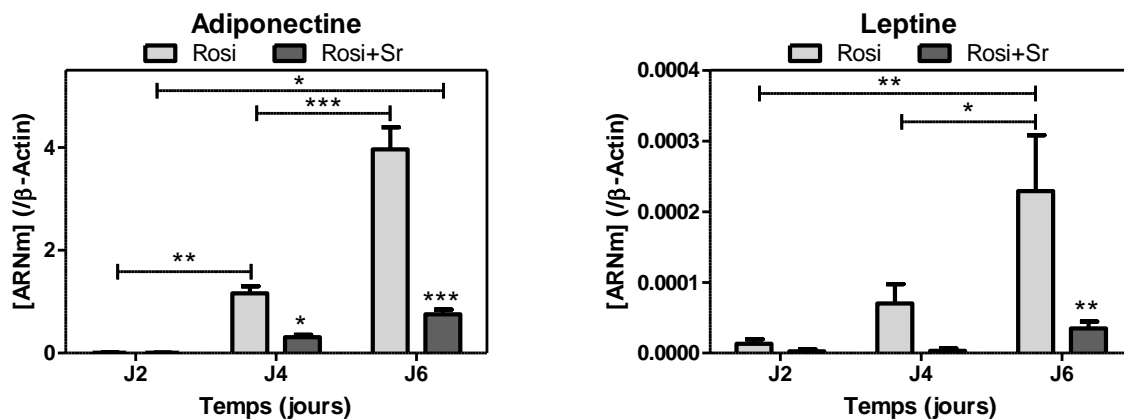


FIGURE 57 : EXPRESSIONS DES GENES DE TISSUS ADIPEUX BLANCS (ADIPONECTINE ET LEPTINE)
Cultures adipocytaires de C3H10T1/2 traitées au strontium (3mM), cinétique à 2, 4 et 6 jours de différenciation. Barres d'écart à la moyenne, Anova 2 voies, *p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001 (N=6).

Nos C3H10T1/2 différenciées par traitement à la rosiglitazone, présentent une nette augmentation de l'expression de la leptine et de l'adiponectine (Figure 57), ce qui montre une activité endocrine similaire à celle du tissu adipeux blanc, comme déjà décrite par Krings et coll. (Krings et al. 2012). Cependant, Laharrague et coll. assure que cette sécrétion est moins importante que la sécrétion par le tissu adipeux blanc, en comparant les niveaux de leptine d'adipocytes de la moelle osseuse avec ceux des adipocytes blancs de l'épididyme (L.-F. Liu et al. 2011). C'est ce que nous retrouvons aussi, sachant que des deux gènes ont été normalisés grâce à une gamme effectuée sur du tissu adipeux blanc de souris. Ici encore, le traitement au strontium (3mM) montre sa forte activité inhibitrice de l'adipogénèse sur ces deux marqueurs.

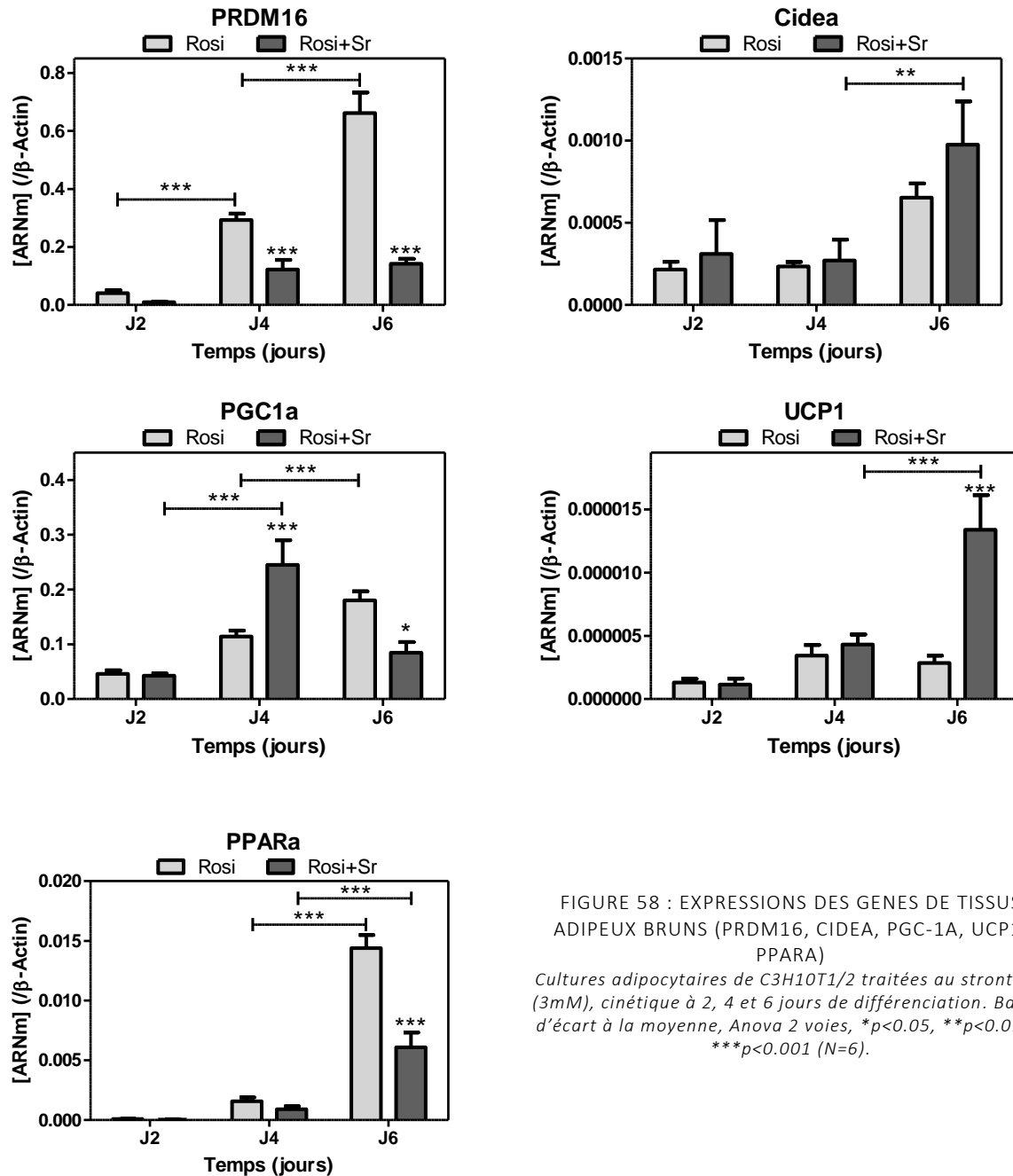


FIGURE 58 : EXPRESSIONS DES GENES DE TISSUS ADIPEUX BRUNS (PRDM16, CIDEA, PGC-1 α , UCP1, PPAR α)

Cultures adipocytaires de C3H10T1/2 traitées au strontium (3mM), cinétique à 2, 4 et 6 jours de différenciation. Barres d'écart à la moyenne, Anova 2 voies, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ (N=6).

En ce qui concerne les marqueurs de l'adipogénèse brune, PRDM16 (PR domain containing 16), PPAR α , Cidea (Cell death-inducing DNA fragmentation factor-like effector-a), PGC-1 α et UCP1 (dans une moindre mesure pour ce dernier) sont induits pendant la différenciation adipocytaire de nos C3H10T1/2 (Figure 58), renforçant l'idée d'un phénotype intermédiaire pour les adipocytes jaunes.

Mais les résultats divergent quant à l'action du strontium. PRDM16 et PPAR α apparaissent inhibés, tandis que Cidea, PGC-1 α (à J4) et UCP1 (à J6) sont activés par le strontium. De deux choses l'une, soit ces trois derniers acteurs sont activés sans l'intervention de PRDM16, normalement le facteur de transcription permettant réaliser la transdifférenciation entre adipocytes blancs et beiges en induisant Cidea et PGC-1 α , soit ces gènes sont induits pour une autre raison, limiter la concentration en ERO intracellulaires.

En effet, PGC-1 α et PPAR α permettent d'activer l'expression d'UCP1, qui en découplant la mitochondrie limite la génération d'ERO. PGC-1 α semble d'abord être induit par le strontium à J4 puis ensuite suit l'augmentation de l'expression d'UCP1 à J6. Ces résultats, plutôt que montrer la transdifférenciation des adipocytes jaunes en bruns par le strontium, renforcent plutôt l'activité antioxydante du strontium par l'action d'UCP1. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait réaliser des mesures de la respiration mitochondriale de nos cellules, afin de mettre en évidence le découplage réalisé par UCP1.

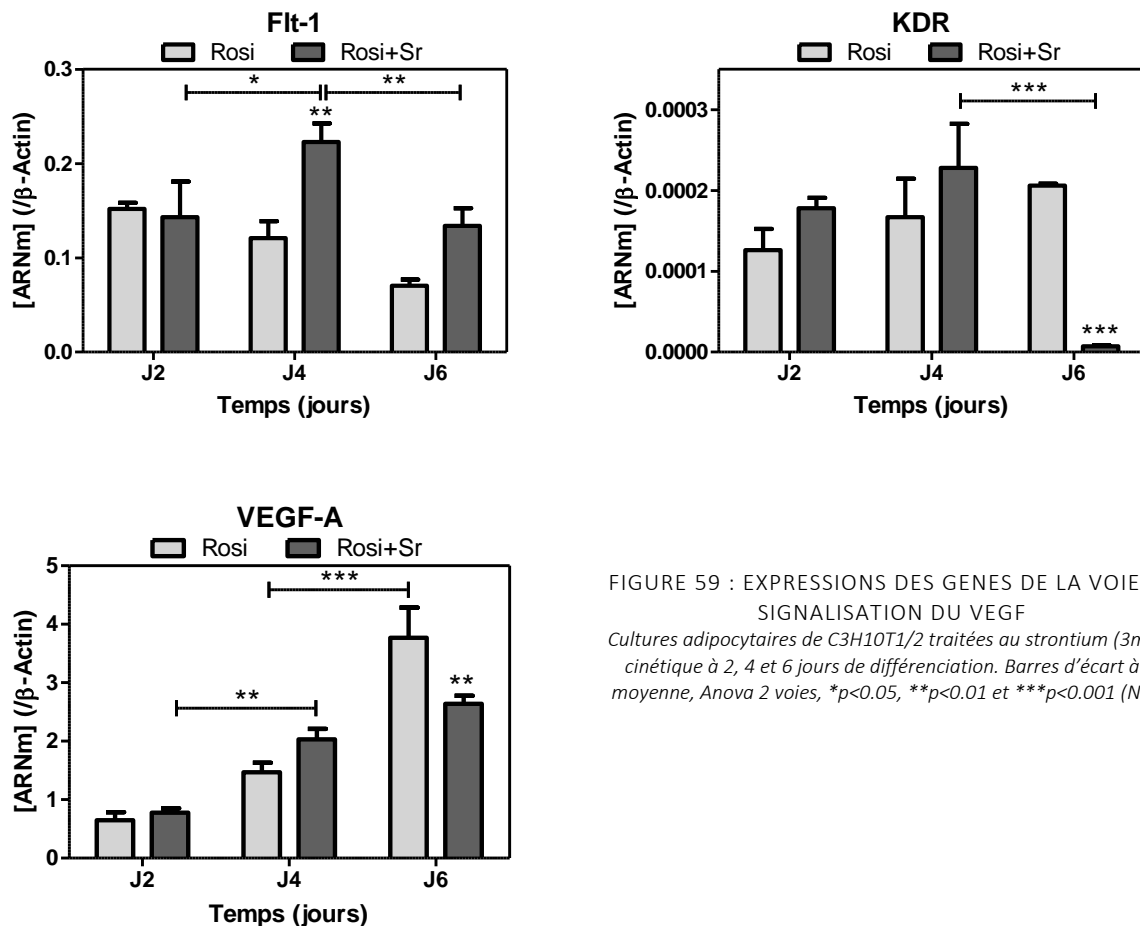


FIGURE 59 : EXPRESSIONS DES GENES DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU VEGF
Cultures adipocytaires de C3H10T1/2 traitées au strontium (3mM), cinétique à 2, 4 et 6 jours de différenciation. Barres d'écart à la moyenne, Anova 2 voies, *p<0.05, **p<0.01 et ***p<0.001 (N=6).

Nous avons vu qu'un haut niveau d'activité thermogénique des adipocytes bruns ou des adipocytes jaunes requiert un fort taux de perfusion sanguine afin d'apporter d'une part l'oxygène et les acides gras nécessaires au fonctionnement des adipocytes pour produire de l'énergie et des ostéoblastes pour former l'os, et d'autre part de dissiper la chaleur ainsi produite (Motyl et Rosen 2011). Il existe donc aussi une relation fine entre os, tissu adipeux et angiogenèse, beaucoup de cas d'obésité montrant un dysfonctionnement vasculaire associé ainsi qu'une perte osseuse. Les pré-adipocytes expriment ainsi de nombreuses intégrines qui vont guider leur migration jusqu'au réseau de capillaire sanguin afin d'activer le développement à la fois des adipocytes et de l'angiogenèse au même endroit. Ceci explique aussi la forte activité de Rac1 en tout début d'adipogénèse pour permettre la migration jusqu'aux vaisseaux, ensuite réduite pour effectuer la maturation des adipocytes. Le développement des adipocytes nécessite donc un remodelage et une maturation continue de la vascularisation (Cao 2007), d'où l'importance du VEGF !

3. LES VOIES DE SIGNALISATION DU VEGF

Le VEGF-A est couramment associé chez l'adulte au développement des adipocytes blancs et donc de l'obésité.

Nos résultats d'adipocytes traités au strontium montrent ainsi une inhibition du VEGF-A ainsi que du récepteur FLK-1 au VEGF, avec en parallèles une activation du récepteur Flt-1 (Figure 59). Ces données vont dans le sens de la limitation de l'adipogénèse par la répression de la voie du VEGF servant à recruter les vaisseaux sanguins et donc permettre la croissance des adipocytes. De même Flt-1 peut aider à limiter au maximum la signalisation du VEGF par son récepteur clé, FLK-1 (Tam et al. 2009), qui est en plus très réprimé. Par contre, cette signalisation autocrine du VEGF sur l'adipogénèse reste peu expliquée pour le moment, à part l'équipe de Song qui explique qu'elle permet une stimulation prolifération et de la différenciation des adipocytes entre eux, par activation de la voie PI3K/Akt/mTOR (S.-Y. Song, Chung, et Sung 2010).

Par ailleurs, le VEGF a tendance à être induit par le strontium dans nos adipocytes à J4 de traitement, avant d'être inhibé à J6. L'induction transitoire du VEGF à J4 peut permettre d'induire cette voie Akt qui joue dans l'activation du PGC-1 α , qui est justement augmenté à J4 dans nos cultures traitées au strontium. En effet, les équipes de Wang et de Wright montrent l'importance de la voie VEGF/Akt/PGC-1 α dans la biogénèse de la mitochondrie sur les cellules endothéliales (Y. Wang et al. 2011; Wright et al. 2008). Ces données peuvent expliquer l'induction du PGC-1 α à J4 qui permet ensuite l'expression d'UCP1 limitant la production d'ERO et donc l'adipogénèse par le strontium.

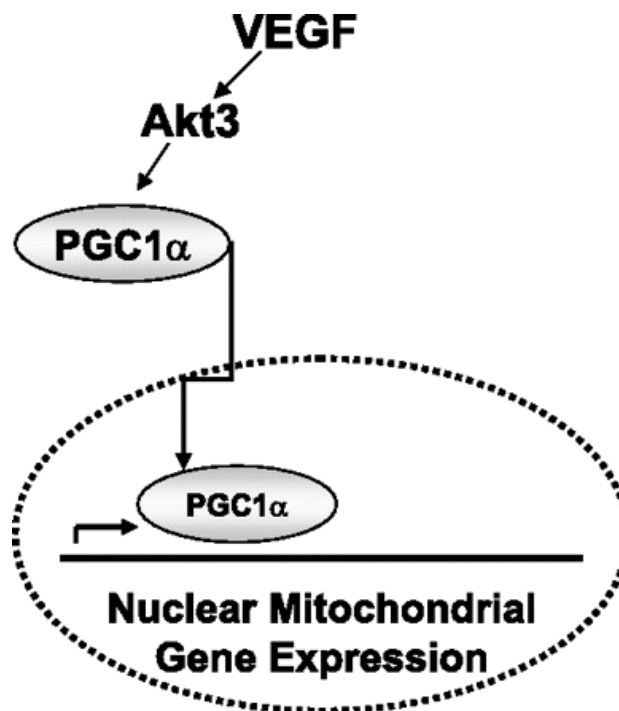


FIGURE 60 : LE VEGF INDUIT LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE PAR LA VOIE AKT/PGC-1A
(Y. WANG ET AL. 2011)

Finalement, nous avons aussi regardé le VEGF-B, dont l'expression, contrairement au VEGF-A, est intimement liée aux gènes mitochondriaux ayant un rôle dans le métabolisme énergétique. Il a été également montré comme étant associé à la régulation du métabolisme des protéines de transport des acides gras (FATP) par le biais du récepteur Flt-1 et de la neuropiline (Nrp-1). Ainsi, des souris KO pour le VEGF-B ont une diminution de leur tissu adipeux bruns et une augmentation de leur tissu adipeux blanc (X. Li 2010; X. Li et al. 2009). De plus, une répression du VEGF-A chez des souris, induit l'activation des gènes des adipocytes bruns (PGC-1 α , UCP1, PRDM16), en augmentant en parallèle le VEGF-B (Lu et al. 2012).

En fait, *in vitro*, la stimulation par le VEGF-B sur des cellules endothéliales induit l'expression des protéines de transport des acides gras (FATPs), ce qui augmente le taux de transport de ces acides gras à travers l'endothélium. *In vivo*, les souris déficientes en VEGF-B montrent en effet une absorption plus faible des acides gras, entraînant une faible accumulation des acides gras dans le cœur, les muscles ou même les adipocytes bruns. Ces acides gras non absorbés se retrouvent finalement dans les adipocytes blancs où ils s'accumulent, ceci résultant à une augmentation de la graisse corporelle et du poids des souris. Cet effet du VEGF-B sur l'absorption endothéliale des acides gras passe par son récepteur VEGFR-1 (ou Flt-1) et Nrp-1 (cf. schéma) (C. E. Hagberg et al. 2010; C. Hagberg et al. 2013).

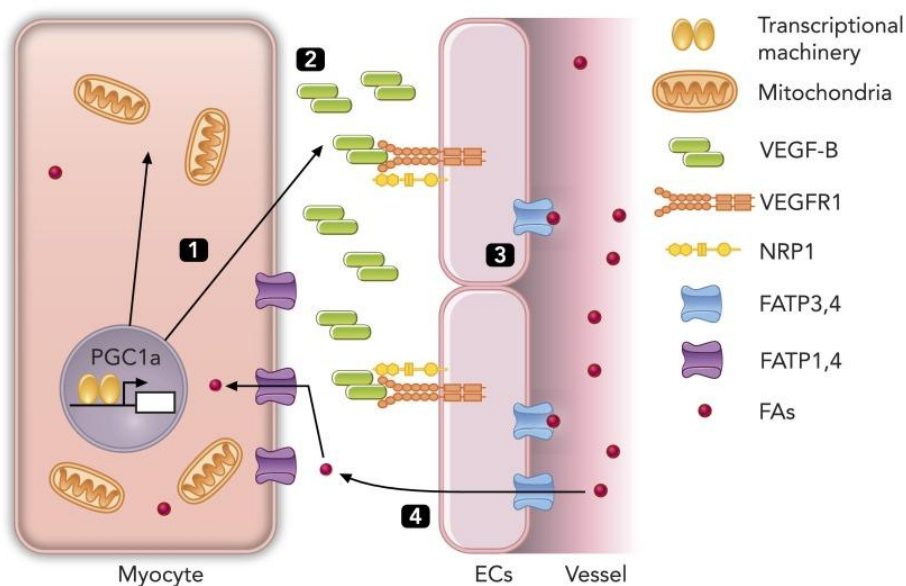


FIGURE 61 : LE RÔLE DU VEGF-B DANS LE TRANSPORT TRANS-ENDOTHELIAL DES ACIDES GRAS
FATP : fatty acid transporter proteins, FA : fatty acid (C. HAGBERG ET AL. 2013)

Cependant, notre traitement au strontium montre au contraire une répression du VEGF-B chez les adipocytes et pas de différences sur le co-récepteur Nrp-1. Ces données suggèrent une inhibition de la voie du VEGF par le strontium, quelque soit sa forme (A ou B) afin de limiter l'adipogénèse. Par contre, la signalisation autocrine du VEGF-B sur les adipocytes n'est actuellement pas connue.

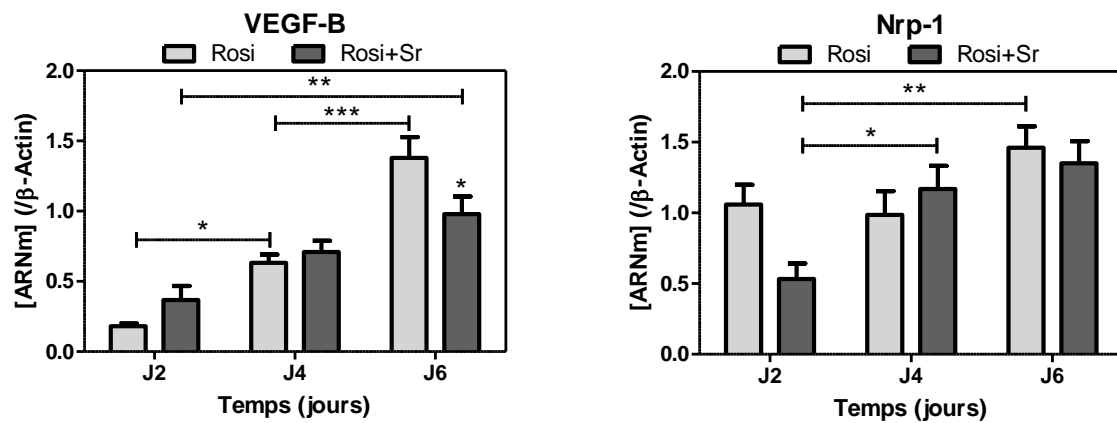


FIGURE 62 : EXPRESSIONS DU VEGF-B ET DE LA NEUROPILINE 1

Cultures adipocytaires de C3H10T1/2 traitées au strontium (3mM), cinétique à 2, 4 et 6 jours de différenciation. Barres d'écart à la moyenne, Anova 2 voies, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ et *** $p<0.001$ (N=6).

CONCLUSION ET DISCUSSION

Nous avons pu mettre en avant au cours de cet article, la signalisation déterminante du facteur Nrf2 sur l'engagement de nos MSC, par le biais de son action sur le cytosquelette, passant par la GTPase RhoA. Cette dernière, permet justement d'activer Nrf2 et ainsi de limiter la production des ERO grâce aux enzymes antioxydantes activées ou à l'inactivation de la NOX (Cho et al. 2007; Daugaard et al. 2013).

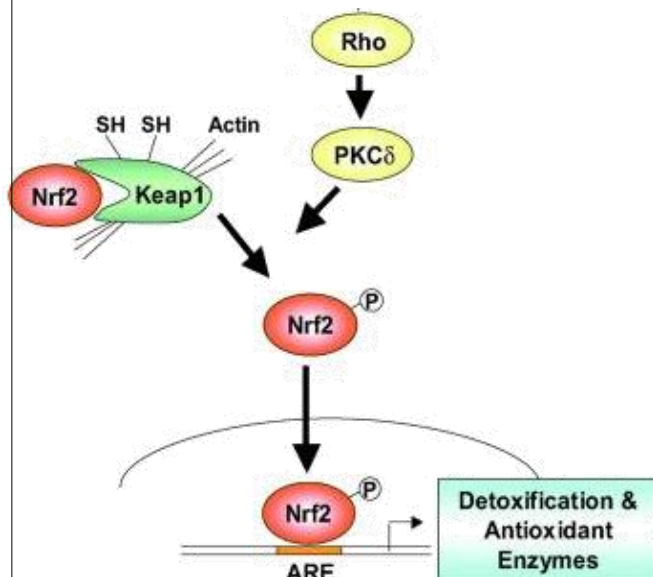


FIGURE 63 : RHOA ACTIVE NRF2 PAR PHOSPHORYLATION
(Cho et al. 2007; Daugaard et al. 2013)

Puisque les antioxydants inhibent l'adipogenèse, favorisent la formation osseuse, et modulent l'activité des GTPases, nous avons étudié l'implication du strontium sur la production des ERO afin d'expliquer son effet inhibiteur sur la différenciation adipocytaire de cellules C3H10T1/2. En accord avec la littérature, le strontium inhibe l'expression des gènes adipocytaires parallèlement à son effet réducteur du taux d'ERO intracellulaires. Le Sr induit également l'expression génique du gène master antioxydant Nrf2. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet du strontium sur l'activité des GTPases RhoA et Rac1. Le strontium induit fortement RhoA dès J1, encore plus à J5, et module peu l'activité de

Rac1, pourtant impliquée dans l'activation de la NOX. Afin de confirmer l'implication de RhoA dans la réduction de l'état oxydatif des cellules par le strontium, son activité a été inhibée par la C3 transférase, qui empêche le passage à sa forme active, liée au GTP. Lorsque l'activité de RhoA est inhibée, le strontium ne montre plus son effet anti-adipogénique et antioxydant, montrant l'importance de la signalisation de cette GTPase dans l'action du strontium. Sachant que RhoA joue dans l'activation de Nrf2, l'ensemble de ces résultats montre donc qu'en conditions adipogéniques, le strontium en induisant RhoA puis Nrf2, empêche la production des ERO par la mise en place d'un système de défense antioxydant enzymatique, deux phénomènes normalement nécessaires au fonctionnement d'un adipocyte mature.

Un autre système antioxydant existe, c'est celui de la protéine découplante UCP1 et son facteur de transcription PGC-1α. Or, le strontium semble aussi moduler cette voie de signalisation en induisant PGC-1α à J4 ce qui entraîne l'augmentation d'UCP1 à J6. Cette voie peut aussi contribuer à la limitation du statut oxydant des cellules traitées au strontium, tout en en activant leurs capacités de thermogénèse pouvant être utiles à la génération d'énergie nécessaires à l'ostéogénèse ou à tout autres processus.

De plus, les adipocytes traités au strontium montrent une inhibition du VEGF-A ainsi que de son récepteur FLK-1, contrairement au récepteur Flt-1 qui est induit par le strontium. Ces données renforcent la limitation de l'adipogénèse par la répression de la voie du VEGF servant à recruter les vaisseaux sanguins et donc permettre la croissance des adipocytes. Elles introduisent aussi une signalisation particulière du VEGF qui sera vue plus en détails dans le deuxième article.

ARTICLE 2

LE CHLORURE DE STRONTIUM STIMULE LES RHOGTPASES POUR CONTRER LES ALTERATIONS DE L'ENGAGEMENT DES CELLULES MULTIPOTENTES LIEES A L'IMPESANTEUR SIMULEE

L'étude des effets du strontium en impesanteur a demandé l'utilisation de cultures 3D sur billes de plastique recouvertes de collagène dans un bioréacteur rotatif, comme déjà présentés dans la stratégie de l'étude. Cette culture 3D était nécessaire pour obtenir des cultures plus physiologiques, mais surtout parce que l'appareil utilisé demandait d'ensemencer les cellules sur un support particulier, permettant sa rotation autour de l'axe. Ces billes collagénées et recouvertes d'hydroxyapatite à leur surface, permettent d'activer l'ostéogénèse de nos C3H10T1/2, du fait de l'effet ostéoinductif de l'hydroxyapatite. La minéralisation s'effectue par bains successifs de phosphatase alcaline et de son substrat, le β -glycérophosphate de calcium, donnant des cristaux venant se complexer au collagène déjà présent sur les billes, et mimant ainsi les minéraux formés par les ostéoblastes. La Figure 64A montre les cellules 40mins après ensemencement sur des billes collagénées. La Figure 64B montre les billes minéralisées, avant ensemencement, obtenues après deux cycles de minéralisation, les minéraux étant indiqués par la flèche bleue.

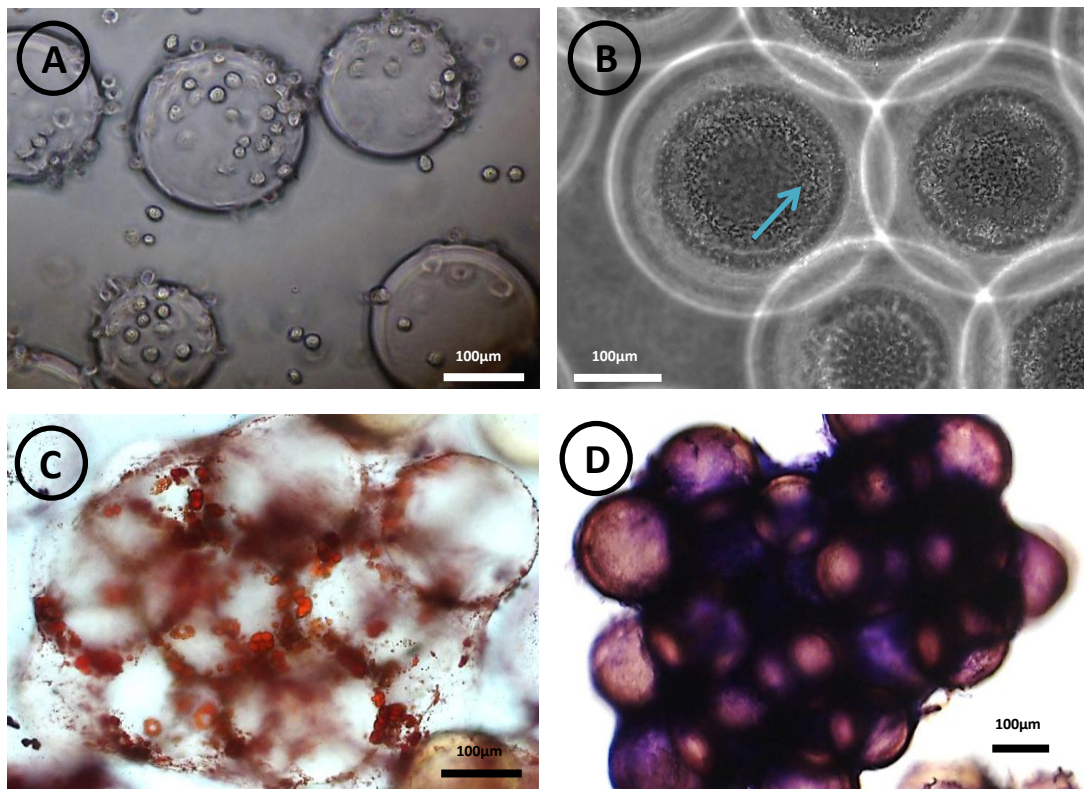


FIGURE 64 : CULTURE 3D DE C3H10T1/2 SUR BILLES
Billes de plastique collagénées (A et C) et billes minéralisées (B et D). Coloration Oil Red O et coloration de la phosphatase alcaline à 8 jours d'inductions.

La caractérisation par spectroscopie en infra-rouge avec Transformée de Fourier montre des minéraux dont la composition et la structure s'apparente à de l'hydroxyapatite pure de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ (

Figure 65). En effet, les pics caractéristiques des groupements phosphates (PO_4) correspondent à ceux de l'hydroxyapatite, de même que les groupements hydroxyles (OH). Les minéraux synthétisés par précipitation montrent quand même des différences avec la présence d'eau (H_2O) qui proviennent de la synthèse réalisée en solution, et la présence de pics de carbonates (CO_3). Ces minéraux correspondent donc plutôt à de l'hydroxyapatite substituée en carbonates et hydratée. Cette substitution en carbonates augmente la solubilité des minéraux, présente une meilleure biocompatibilité et est plus ostéoconductive (Melville et al. 2006).

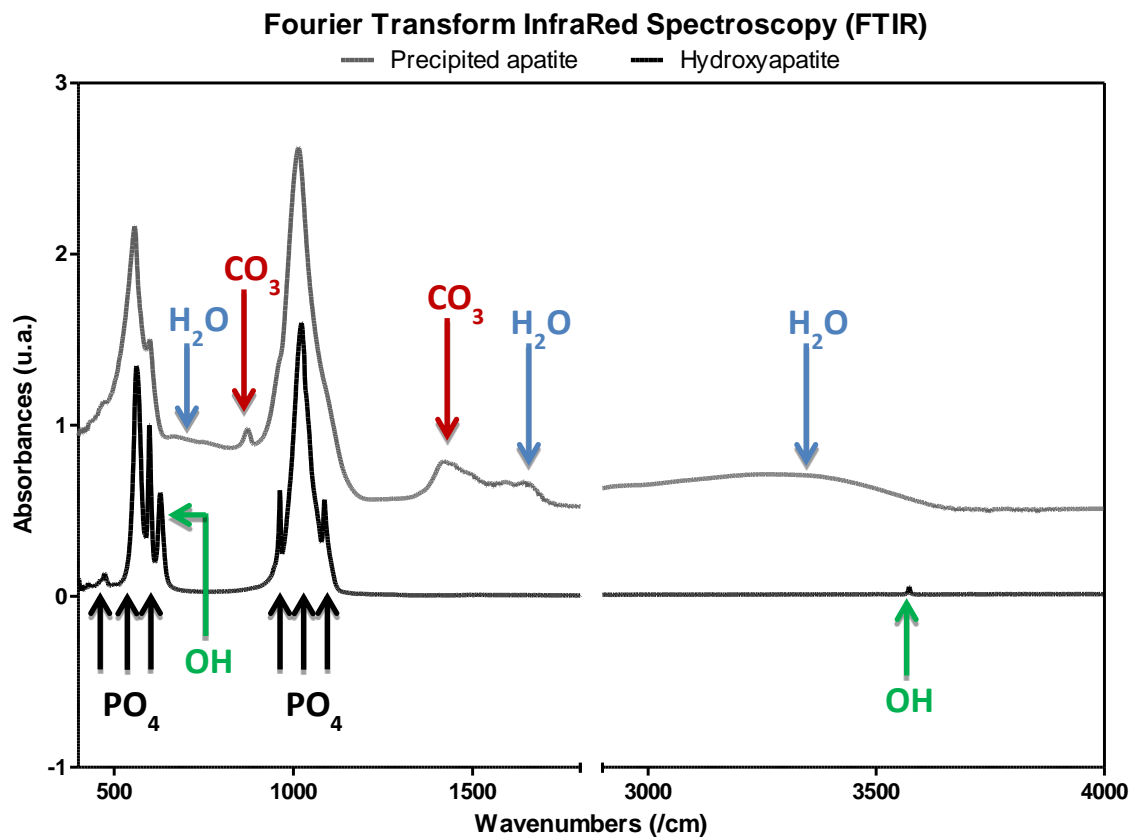


FIGURE 65 : SPECTRE INFRAROUGE PAR TRANSFORMEE DE FOURIER DES MINERAUX D'HYDROXYAPATITE
 Mesures réalisées par spectromètre MIR TF Vertex 70. Spectre allant de 450 à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} .
 L'hydroxyapatite contrôle utilisée est une hydroxyapatite pure, frittée 1h à 1500°C.

Cette culture de C3H10T1/2 sur billes montre en effet en culture une bonne biocompatibilité sur les billes minéralisées, comme en témoignent les résultats d'activité cellulaire (MTT (Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) Figure 66) et de prolifération (BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) Figure 66).

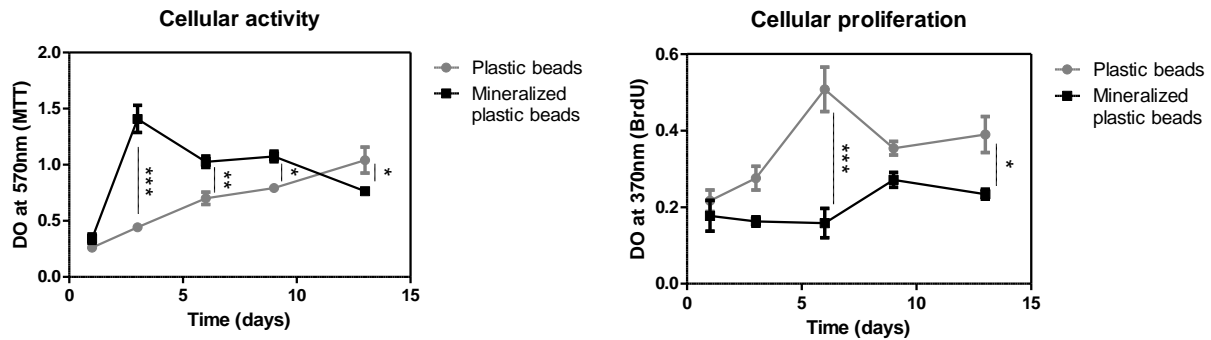


FIGURE 66 : MESURES D'ACTIVITE ET DE PROLIFERATION CELLULAIRES

C3H10T1/2 ensemencées sur billes de plastique collagénées ou sur billes minéralisées. L'activité cellulaire est mesurée par MTT et la prolifération par BrdU à 1, 3, 6, 9 et 12 jours de cultures. Barres d'écart à la moyenne, Anova 2 voies, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ et *** $p<0.001$ ($N=5$).

En ce qui concerne la bioactivité et ostéoinductivité des billes, de façon intéressante, l'activité cellulaire apparaît plus forte sur les billes minéralisées que sur les billes collagénées, tandis que la prolifération est plus faible. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les cellules ensemencées sur les minéraux entrent plutôt dans une phase différenciante que proliférative. En effet, la différenciation en ostéoblastes demande un plus fort niveau d'énergie que la prolifération, les ostéoblastes étant considérés comme des « machines à collagène » dont la production pour la matrice extracellulaire demande beaucoup de ressources.

Effectivement, le facteur de transcription Runx2 est activé de façon significative dès deux jours de culture sur les billes minéralisées (+50%, $p<0.05$), ainsi que le gène ostérix (+40% $p<0.05$)(Figure 67).

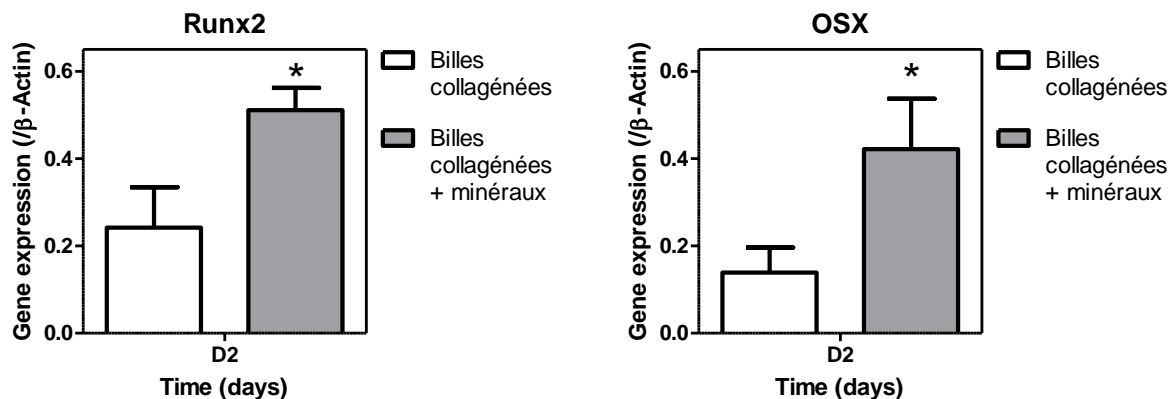


FIGURE 67 : EXPRESSIONS DES GENES OSTEOGENIQUES RUNX2 ET OSX

C3H10T1/2 après 2 jours de culture sur billes minéralisées. Barres d'écart à la moyenne, Test-t * $p<0.05$ ($N=3$).

Ces deux types de billes permettent une optimisation de culture et de différenciation. En milieu adipocytaire (avec de la Rosiglitazone), après 8 jours d'induction, les billes sont chargées d'adipocytes montrant de nombreuses vésicules lipidiques (Figure 64C), avec peu de matrice. En milieu ostéogénique (acide ascorbique, β -glycérophosphate et acide rétinolique), le marquage de la phosphatase alcaline fait apparaître des agrégats de billes couvert de pré-ostéoblastes, avec une matrice extracellulaire plus épaisse et qui donne une couleur « marronnée » aux billes (Figure 64D). Cette différence se retrouve aussi dans la quantité de fibronectine déposée à la surface des billes.

Figure 68) et dans la taille des agrégats dans ces deux types de culture. Les adipocytes forment de petits agrégats en culture de taille assez stable, tandis que les ostéoblastes ont des agrégats dont le nombre de billes attachées augmente progressivement durant les 10 jours de culture (

Figure 68).

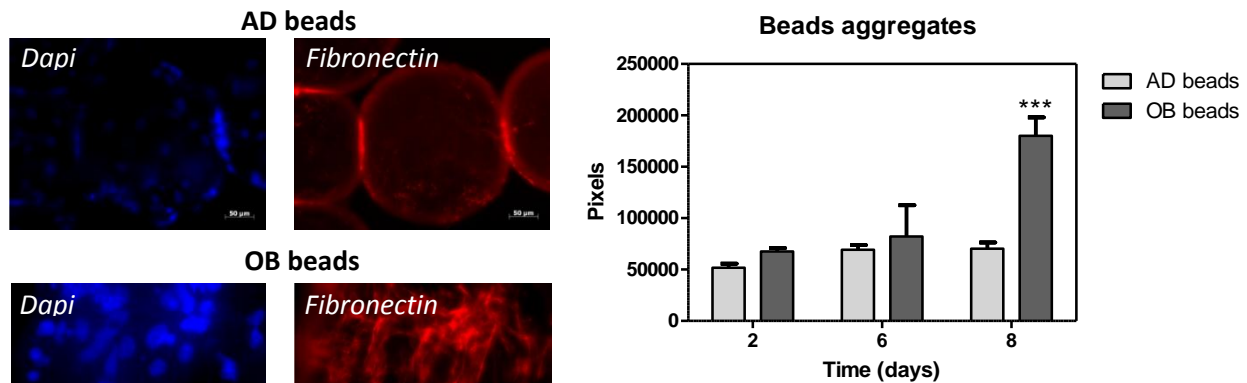


FIGURE 68 : IMMUNOMARQUAGE FLUORESCENT DE LA FIBRONECTINE ET TAILLE DES AGREGATS ADIPOCYTAIRES ET OSTEOGENIQUES

*C3H10T1/2 ensemencées sur billes de plastique collégénées ou sur billes minéralisées. Immunomarquage fluorescent pour la fibronectine effectué après 6 jours d'inductions AD et OB. Tailles des agrégats évaluées en nombre de pixels sur Image J à 2, 6 et 8 jours de cultures. Barres d'écart à la moyenne, Anova 2 voies, *** $p < 0.001$ (N=10).*

L'utilisation du bioréacteur microgravitaire, nous a obligé, après des essais de plusieurs milieux d'induction différents, à définir des conditions de culture 3D ostéogéniques et adipocytaires séparément, avant d'envisager des co-cultures. En effet, les C3H10T1/2 présentent une cinétique de différenciation beaucoup plus rapide pour l'adipogénèse que pour l'ostéogénèse, les adipokines sécrétées en co-culture empêchaient sûrement d'autant plus la différenciation en ostéoblastes des cellules indifférenciées restantes.

Cependant, nos conditions ainsi optimisées nous ont permis d'obtenir de bonnes différenciations adipocytaires et ostéogéniques (Voir Figure 1 de l'Article 2 p.172) séparément, qui finalement s'avèreront nécessaires à la compréhension des différentes signalisations opérées par le strontium dans chacune de ces deux voies.

Dans ce contexte, le premier objectif de ce deuxième article est d'évaluer comment les conditions d'impesanteur simulée affecte la capacité des cellules souches squelettiques à se différencier en pré-ostéoblastes ou en pré-adipocytes. Puis, l'association entre engagement et niveaux d'activité de RhoA et Rac1 sera analysée, ainsi que l'expression du VEGF dans les deux lignées. La question finale étant d'établir le rôle du strontium dans l'activation des RhoGTPase et dans les voies de signalisation des isoformes du VEGF, connues pour être modulées par les contraintes mécaniques.

Article

Counteraction of strontium chloride against simulated microgravity-induced alteration of multipotent cell commitment through stimulation of RhoGTPase

Fiona Louis^a, Wafa Bouleftour^a, Aline Rattner^a, Marie-Thérèse Linossier^a, Laurence Vico^a, Alain Guignandon^{a*}

a : INSERM U1059 - Université de Lyon, Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, F42023, Saint-Etienne France

* Corresponding author

Alain GUIGNANDON

INSERM U1059, LBTO

Faculté de Médecine

15 rue Ambroise PARE

F-42023 Saint-Etienne cedex 2

Email: Alain.Guignandon@univ-st-etienne.fr

Running title: Strontium stimulates RhoA and Rac1 in multipotent cells

Abstract

Microgravity-related cytoskeletal disorganization is associated with an altered balance between osteoblastogenesis (OB) and adipogenesis (AD) of multipotent cells. Strontium chloride (Sr) is known to increase OB and repress AD but its effects on microgravity-related conditions have yet to be established. Our goal has been to investigate early events in this process, focusing on RhoGTPases as controllers of cytoskeletal organization and stem cell commitment. We cultivated C3H10T1/2 on microspheres using the rotating wall vessel (Rotating Wall Vessel, NASA) in order to simulate microgravity-related conditions in AD and OB surroundings independently. Sr-treated C3H10T1/2 cells presented a significant AD repression (-80%, $p < 0.001$ PPAR γ D8) and an activation of OB (+65%, $p < 0.05$ Osterix D8). We established that concomitant RhoA/Rac1 activations were associated with OB enhancement and AD limitation in uncommitted cells. As VEGF splicing is mechanosensitive and its signaling is central in stem cell commitment, we investigated VEGF production, isoforms and receptor expressions. We found that the presence of both matrix-bound VEGF and receptors (flt-1, Flk-1) were associated with RhoA/Rac1 activations. Immobilization of VEGF was discovered to activate specifically RhoA and Rac1 as compared with soluble VEGF (+40%, $p < 0.001$ and +60%, $p < 0.05$ respectively) in uncommitted cells, confirming that dual RhoA/Rac1 is needed to block AD and initiate OB. These results validated Sr as a countermeasure to microgravity-induced alterations of multipotent cell commitment.

Key-words: Microgravity, osteoporosis, strontium, RhoA, Rac1, matrix-bound VEGF

Abbreviations

AD : Adipogenic ; ALP: Alkaline phosphatase ; BSP : Bone sialoprotei ; C/EBP α : CCAAT-enhancer-binding protein α ; Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog ; ECM : Extracellular matrix ; FABP4 : Fatty acid binding protein 4 ; Flk-1 : Vascular endothelial growth factor receptor 2 ; Flt-1 : Vascular endothelial growth factor receptor 1 ; OB : Osteogenic ; OPN : Osteopontin ; OSX : Osterix ; MSC : Mesenchymal stem cell ; PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ; Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 ; RhoA : Ras homolog gene family, member A ; Runx2 : Runt-related transcription factor 2 ; RWV : Rotating Wall Vessel ; Sr : Strontium chloride ; VEGF : Vascular endothelial growth factor ; VEGFc : Cell-associated VEGF ; VEGFm : Matrix-bound VEGF ; VEGFs : Soluble VEGF.

Acknowledgments

This work has received financial support from the European Space Agency, European Research In Space and Terrestrial Osteoporosis (ERISTO) contract number 14232/NL/SH (CCN3). Moreover, the study was also supported by Servier Laboratories (France).

Introduction

Bone loss is currently one of the most serious health hazards of long-term spaceflight. Continuous and progressive loss of calcium in weight-bearing bones (1) is observed in both humans and animals during exposure to microgravity, and is thought to be due to the loss of mechanical stress for the duration of flights (2–4). In fact, in microgravity, the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis for bone marrow mesenchymal stem cells shifts in favor of adipocytes (5), resulting in reduced bone mass and an altered bone architecture (6). Moreover, osteoporotic bones display an increased accumulation of adipocytes in the trabecular bone marrow space (7–9).

Adipocytes and osteoblasts differ from a common mesenchymal precursor cell. This raises the question of whether bone loss is a consequence of gravity alterations in the control of osteoblast/adipocyte fates from mesenchymal stem cells. Our understanding of the control of this fate is incomplete: we suggest that key regulators of multipotent cell commitment such as RhoGTPases are implicated. Indeed, small GTP-binding proteins of the Rho family (RhoA (Ras homolog gene family, member A), Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)) are key regulators for the organization and turnover of the cytoskeleton, formation of cell–matrix adhesions, transcriptional control of gene expression, cell survival and proliferation. More specifically, RhoA is well characterized for its role in stress fiber formation in cells (10); it mediates through phosphorylation and inactivation of the actin-severing protein cofilin and myosin phosphatase (11, 12).

Also, RhoA has been shown to be implicated in the mesenchymal stem cells (MSC) lineage commitment (13, 14). It is therefore likely that Rho-GTPases are directly involved in cellular gravity perception and may participate in the alterations induced in the absence of gravity (15, 16), since the overexpression of constitutively active RhoA in cells exposed to microgravity conditions leads to a recovery of stress fibers comparable with that of cells cultured under normal gravity (17). Thus, a reduced activation of RhoA during space flight contributes to the altered MSC differentiation observed (5, 18). However, the pathway by which the RhoA activity regulates the differentiation of MSC has yet to be elucidated.

We propose to test the role of vascular endothelial growth factor A (VEGF) in the control of our multipotent model for the followings reasons. Several studies suggest that VEGF stimulates osteoblast differentiation (19–21). According to the results of Liu et al. (22), VEGF signaling controls multipotent cell commitment. When VEGF/Flk-1 (Vascular endothelial growth factor receptor 2) translocates to the nucleus, the cell is committed to osteogenesis by way of LaminA/C-dependent regulation of Runx2 (Runt-related transcription factor 2, osteogenesis master gene) transcription. If VEGF/Flk-1 is unable to translocate to the nucleus, Runx2 transcription is repressed and adipogenesis is activated. Furthermore, VEGF alternative splicing is regulated by mechanical stresses such as stretching/compression (23–25), or microgravity (26). Interestingly, matrix-bound or soluble VEGF possesses distinct signaling abilities (27, 28) that might be linked to a differential ability to stimulate RhoGTPases.

In this context our first objective was to evaluate how simulated microgravity, as provided by the Rotating Wall Vessel (RWV), affected the ability of multipotent cells to differentiate into committed osteoprogenitor or pre-adipocytes and to analyze the association between commitment and levels of RhoA and Rac1 activities as well as VEGF expression in both lineages. Strontium has been shown to promote osteoblastogenesis (29) and prevent adipogenesis of MSC (30). Thus, our second objective was to establish, in our cell model, the role of strontium in the activation of RhoGTPase and VEGF pathways.

We cultivated embryonic fibroblasts (C3H10T1/2) on microspheres in the NASA-approved rotating wall vessel in order to simulate microgravity-related conditions. Cells were treated under conditions where both adipogenesis (AD; collagen plastic beads) and osteogenesis (OB; apatite coated on collagen plastic beads) were promoted. These 3D cultures were treated or not with 5-mM of strontium for up to 8 days of differentiation. We evaluated the RhoA and Rac1 activities during AD and OB as well as VEGF isoforms (120, 164 and 188) in addition to receptor expressions. It was established that strontium was able to sustain RhoA and Rac1 activities under RWV conditions and this dual activation was associated with expression of matrix-bound VEGF and receptors (Flt1 (Vascular endothelial growth factor receptor 1) and/or Flk-1). In conclusion, we observed that immobilized VEGF was able to stimulate both RhoA and Rac1 more efficiently than its soluble counterpart. This led us to propose that immobilization of VEGF by uncommitted cells triggers dual RhoA and Rac1 activation leading to the promotion of osteogenesis and the restriction of

adipogenesis, helping bone cells to resist against microgravity conditions.

Materials and Methods

Reagents: Cytodex 3, α MEM, DMEM, L-ascorbic acid, β -glycerophosphate, retinoic acid, strontium chloride, oil red O, trypsin-EDTA, PBS, glycerol phosphate calcium salt, phosvitin from egg yolk, phosphatase alkaline from bovine intestinal mucose, vascular endothelial growth factor 164 from mouse, tris(hydroxymethyl)amino-methane, polyethylene-sorbitan monolaurate (tween 20), triton x100 and tri-reagent were purchased from Sigma Aldrich (St-Louis, USA). Rosiglitazone was obtained from Interchim (Montluçon, France). RiboGreen RNA and PicoGreen DNA quantitation kits were purchased from Invitrogen (Life Technologies, Eugene, OR, USA). RNeasy Plus Mini Kit was acquired from Qiagen (Courtaboeuf, France). Light cycler-FastStart DNA Master, SYBR Green I dye (Lightcycler faststart DNA master SYBR green I) was procured from Roche Diagnostics (Meylan, France). The protein assay kit Pierce® BCA (bicinchoninic acid) was obtained from Thermo Scientific (Rockford, USA). Nonidet P40 substitute was purchased from Fluka Biochemika (Steinheim, Germany). FBS (foetal bovine serum) was acquired from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel).

Rotary wall vessel (RWV) bioreactor: The NASA RWV bioreactor (size 120mL) was purchased from Synthecon (Houston, USA). It consists of a cylindrical growth chamber that contains a flat silicone rubber gas transfer membrane for oxygenation. The fluid dynamic principles of the RWV bioreactor allow oxygenation without turbulence and reduce fluid shear forces. The culture technique commonly employed is to first inoculate the cells on microcarrier

beads, and then to culture them in the rotary vessel (31). For the cell seeding, the ratio 100 mg beads/10⁶ cell was used. Speeds were adjusted according to the level of aggregation of our culture and were 60-80 rpm for adipocytes cultures and 75-95 rpm for osteoblast cultures as the latter presented larger aggregates.

Bead mineralization: Beads with apatite collagen complexes (ACCs) were prepared using a previously described method (32) with slight modifications. Briefly, Cytodex 3 microcarriers already coated with collagen were placed in 35-mm cell culture-treated dishes, and immersed in various baths based on tris-buffered saline (TBS) at 200 mM, pH = 8.5. The first bath contained alkaline phosphatase and egg yolk phosphovitin (0.4 mg/ml) at 37 °C, and the second contained calcium β -glycerophosphate (6 mM) at 37 °C. This successive immersing induced the deposition of a hydroxyapatite-mimicking bone mineral on the beads (32, 33). The duration and the number of successive incubations determined the amount of apatite mixed with the collagen. A 3- to 10-h (first bath-second bath) cycle provided an ACC where 20% of the collagen surface was mixed with apatite. This cycle was repeated twice, and thus led to an ACC where 40% of the collagen surface was mixed with apatite, which was used in the experiments for osteogenic differentiation. The dishes were finally washed with water followed by α MEM medium before the cells were seeded.

Cell culture: The mouse multipotent mesenchymal cell line C3H10T1/2 (clone-8; American Type Culture Collection, LGC Promochem, Molsheim, France) was kept in T75 flasks in DMEM supplemented with 10% FBS, 2-mM l-glutamine, and antibiotics (50-U/ml penicillin and 50- μ g/ml streptomycin), in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37

°C. In these experiments, the cells were used at passage 12 and a new ampoule of cells from liquid nitrogen storage was thawed before each experiment. 20.10⁶ cells were seeded on 200 mg of microcarrier beads (Cytodex 3), mineralized or not, in 5 ml α MEM during 4h at 37°C and then cultured in 90-mm petri dishes untreated for culture with 10 ml of medium.

After 2 days of preculture in this proliferation medium, the C3H10T1/2 cells were differentiated in an adipogenic (AD) or osteogenic (OB) medium. The AD medium consisted of complete α MEM with 1 μ M of rosiglitazone, a potent agonist of PPAR γ , and was used with plastic beads. The OB medium comprised 5mg/mL L-ascorbic acid, β -glycerophosphate at 10⁻³ M and retinoic acid at 10⁻⁵ M, and was used with mineralized plastic beads. The AD or OB medium were renewed every 2 days. Strontium chloride powder was diluted in sterile water and then filtered. For the experiments, it was used at 5 mM and was added for each medium renewal. When added in the RWV, the quantity was enough to last until the end of the experiment, 6 days later, and a complete renewal of the 120 mL of RWV medium could thus be avoided.

RNA extraction and RT-PCR: RNA extraction and RT-PCR were performed on C3H10T1/2 cells to analyze cell differentiation. C3H10T1/2 cells seeded on beads were harvested after 2 days of preculture, and after 2, 4, 6 and 8 days in AD or OB culture medium (Fig 1). The total RNA was isolated using TRI-Reagent according to the manufacturer's instructions. Briefly, chloroform was added to separate the aqueous phase containing RNA from the interphase and the organic phase. The aqueous phase was recovered and precipitated with isopropanol. The RNA

pellets were then washed in 70% ethanol. Finally, after air-drying for 1-2 min, the RNA pellets were dissolved in RNase-free water and then purified with the RNeasy Plus Mini Kit. The RNA concentration was assessed with the Ribogreen kit, and the RNA quality was verified with the Experion automated electrophoresis station (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2 µg of total RNA with the iScript™ cDNA Synthesis kit for Thermocycler (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. For quantitative RT-PCR, 0.08 µg of cDNA mixture was prepared for CFX96™ (BIO-RAD, Hercules, CA, USA), real time PCR detection system, using SYBR Green I dye (Lightcycler faststart DNA master SYBR green I). Primer sequences and full names of the markers are listed in Table 1. For each gene, expression levels were normalized to β -actin expression, which did not change during the culture time and the conditions used (not shown). Amplified products were examined for size estimation on a 2% agarose gel with 1 µg/ml ethidium bromide and a DNA molecular weight marker, cf. Table1.

DNA measurements: The PicoGreen DNA quantitation kit was used to measure double-stranded DNA concentrations in solution. All reagents (dsDNA reagent, TE buffer: 200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.5 and lambda DNA standard) were obtained from the kit and the assay was performed as outlined in the protocol from the manufacturer. The data were corrected for cell-free values. Samples were placed in a black 96-well plate and excited at 485 nm. The emission was measured at 538 nm using a fluorometer (CFX96™, BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

RhoA and Rac1 G-LISA assays: Levels of active forms GTP-RhoA and GTP-Rac1 were

analyzed by assessing the RhoGTPase activity using respective G-LISA assays (RhoA, Rac1 G-LISA Activation Assays; colorimetric format; Cytoskeleton from Tebu-Bio (Le Perray en Yvelines, France)) following the manufacturer's protocol. Values obtained were normalized to the positive control of the kit and then to the DNA content of the cell lysates, measured with a PicoGreen DNA quantitation kit.

VEGF ELISA: The VEGF content was measured in sample lysates (matrix-bound or intracellular VEGF) and medium (soluble VEGF) with an ELISA kit (Mouse VEGF DuoSet, R&D, France), according to the manufacturer's instructions. Briefly, samples were lysed in lysis buffer composed of PBS with 0.5% Nonidet 40, and 1% PIC (proteases inhibition cocktail). Each sample was run in duplicate in the assay and fluorescence was determined with a multiwell plate spectrophotometer (Multiskan spectrum microplate spectrophotometer). The data were corrected for fresh lysis buffer values, determined from a standard curve and normalized to the DNA content of the cell lysate, measured with a PicoGreen DNA quantitation kit. Concerning medium for soluble VEGF, samples were run without lysis and data were corrected with fresh medium values and normalized to the total protein contents of the medium, measured by the Protein assay kit Pierce® BCA (bicinchoninic acid).

VEGF immobilization on beads: For matrix-bound VEGF immobilized beads, cytodex 3 coated with collagen and mineralized beads were left overnight at 4°C in VEGF164 solution prepared in sterile water. The ratio was 80ng VEGF for 5 mg beads. Water supernatant was then aspirated for quantification of remaining VEGF by ELISA, after first allowing the beads to settle. ELISA

VEGF quantification showed an average of remaining VEGF of 0.351 ng (\pm 0.003) and 0.171 ng (\pm 0.015) for collagen and mineralized beads, respectively, so it was considered that all of the 80 ng of VEGF was immobilized on the beads. The beads were then washed twice in α MEM before the cells were seeded with the same ratio as usual (5.105 cells for 5 mg of beads). G-LISA quantifications for RhoA and Rac1 assays were realized 1h and 4h after the cell seeding. Concerning soluble VEGF on the beads, the cells were seeded at the same ratio during 24h after which the VEGF164 solution with a final quantity of 80 ng for 5 mg beads was added to α MEM. G-LISA quantifications for RhoA and Rac1 assays were also realized 1h and 4h after addition of soluble VEGF164. The values obtained were normalized to the positive control of the G-LISA kits and then to the DNA content of the cell lysates, measured with a PicoGreen DNA quantitation kit.

Statistical analysis: The obtained data were analyzed with the GraphPad Prism 5 and GraphPad InStat 3 softwares. The results from each group were compared using One-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons post hoc test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Culture under rotating wall vessel conditions affected the MSC differentiation

Mesenchymal stem cells C3H10T1/2 were seeded on non-mineralized or mineralized beads with a ratio of 20.106 cells for 200 mg beads. They grew in static condition during 4 days and then in simulated microgravity for up to 8 days (**Fig 1**). Under these conditions we observed that the adipogenesis markers increased continually during the culture (**Fig 2A**) (*PPAR γ* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), *C/EBP α* (*CCAAT-enhancer-binding protein α*), *FABP4* (*Fatty acid binding protein 4*) and *Adiponectine*, until +99% $p < 0.001$ for FABP4). The osteogenesis, assessed by *alkaline phosphatase (ALP)*, *osterix (OSX)*, *bone sialoprotein (BSP)* and *osteopontin (OPN)* gene expression, did not increase during the 8 days of culture and even sometimes significantly decreased (BSP, -80% $p < 0.01$) (**Fig 2B**). RWV promoted adipogenesis, as shown in **Fig 2A**, without allowing osteogenic induction (**Fig 2B**).

Strontium acts as a negative regulator of adipogenesis and a positive regulator of osteogenesis

To assess how the strontium treatment affects the differentiating adipocytes, a number of adipogenic genes were tested by quantitative real-time PCR: *PPAR γ* , *C/EBP α* , *FABP4* and *adiponectin*. For osteogenesis commitment, *ALP*, *OSX*, *BSP* and *OPN* were measured. As expected (30), strontium massively inhibited adipogenesis (down to -90% $p < 0.001$ for FABP4 at day 8) and also promoted osteogenesis (up to +95% $p < 0.001$ for BSP and OPN at day 8) (**Fig 2A and 2B**) (29) when used at a concentration of 5 mM.

As shown in **Fig 1B**, the proportion of cells showing positive staining for Oil Red O, and thus intracellular lipid accumulation, was lower in strontium-treated cultures as compared to in untreated cells. Concerning alkaline phosphatase staining, similarly, cells in both groups were stained very positively and showed no differences (**Fig 1C**).

Strontium regulates RhoA and Rac1 activities in committed adipocytes and osteoblasts

As GTPases have been implicated in multipotent cell commitment, we used specific ELISA to investigate activities for RhoA- and Rac1-GTP under both OB and AD conditions of culture, with or without Sr treatment.

RhoA decreased during adipogenesis (-65%, $p<0.01$), whereas it was maintained in intermediate amounts during osteogenesis (around 20%) (**Fig. 3A**). Rac1 tended to increase during osteogenesis (+50%, NS) and decrease during adipogenesis (-50%, NS) (**Fig. 3B**). As expected, RhoA significantly decreased under simulated microgravity from day 2 to day 8, but only during adipogenesis and not for osteogenesis (**Fig 3A**).

According to the differentiation stage, we could clearly identify two types of strontium responses, (day 2=majority of uncommitted cells and day 8=majority of committed cells). After 2 days of induction, regardless of the conditions, we observed significant increases in RhoA-GTP and Rac1-GTP activities (e.g. for RhoA : +50%, $p<0.01$ at D6 in AD and +80% at D6 in OB, $p<0.001$; for Rac 1 : +70%, $p<0.01$ at D6 in AD and +40%, $p<0.05$ at D6 in OB). A similar profile was found up to 6 days of culture under both AD and OB conditions. Concerning the RhoGTPase activities at day 8, at which time a majority of cells had been committed

(according to the molecular profile), we found that RhoA was no more activated by the Sr treatment than untreated OB cells. On the contrary, the RhoA activity was still significantly increased under AD conditions and Sr (+40%, $p<0.05$ D8 vs untreated matching control samples).

Similarly to RhoA, we found at day 8 that the Rac1 activity became particularly decreased under Sr as compared to untreated cells in OB conditions (-15%, $p<0.05$) and that the Rac1 activity was significantly increased under Sr and AD conditions (+20%, $p<0.01$). These results raise the question of a differential RhoGTPase activation attributed to a differential VEGFR signaling.

Differential regulations on matrix-bound and soluble VEGF by strontium

Vascular endothelial growth factor A (VEGF) seems to play important regulatory roles on the control of osteoblast/adipocyte fates in MSC (22). Thus, ELISA was performed on VEGF protein on culture supernatants to quantify the soluble VEGF (VEGFs) proteins (**Fig 4A**) as well on lysates to quantify cell-associated VEGF (VEGFc) (**Fig 4B**). VEGFc comprised matrix-bound VEGF and intracellular VEGF.

During adipogenesis, both soluble and cell-associated VEGF increased from day 2 to day 8 of culture. The strontium treatment significantly reduced both the content of VEGFs and VEGFc (-40%, $p<0.05$ and -70%, $p<0.001$, respectively) at day 8. The effects of Sr on VEGFs under AD conditions seemed to be complex as its secretion initially increased (day 2 and 6) and decreased at day 8. The important production of VEGFs associated with adipogenesis in our culture was not significantly altered by the Sr treatment (**Fig 4A**).

Concerning osteoblastic conditions, VEGFs and VEGFc production remained constant during the duration of the experiment, which might be coherent with the limitation of osteogenesis in these rotated cultures. Concerning the Sr effects, we observed a significant increase in VEGFc secretion only at day 6 (-70%, $p<0.05$) but no other notable changes were found. For the VEGFc production, we discovered an increased production at day 6 and 8 (+50% and +60%, $p<0.05$ respectively) matching the osteogenesis as seen from the molecular profile (Fig 4B).

In summary, concerning the VEGF production under Sr, we found that Sr inhibited VEGFs and VEGFc production in committed adipocytes and promoted only VEGFc in committed osteoblasts.

Strontium differentially regulates VEGF188 isoform expression under OB and AD conditions

Unlike the protein assay, VEGF 120, or soluble, varied little over time and with the strontium treatment (Fig 5A). Similarly, changes in VEGF 164 were not significant, except for a slight tendency to increase when treated with strontium during osteogenesis (Fig 5B). Interestingly, the VEGF 188 isoform expression matched the protein assay on the cell lysates perfectly, showing an induction in osteoblasts and inhibition in adipocytes, with strontium (Fig 5C).

Under our conditions, adipogenesis is characterized by a late upregulation of VEGF164 and 188 (not 120) whereas Sr downregulates them (-35% and -70%, respectively). Interestingly, under osteogenic conditions, we observed a significant increase in VEGF188 isoform expression under Sr from day 2 to day 8

(+60%, $p<0.05$). One should note that, at day 2 under osteogenic conditions, all isoforms of VEGF were upregulated.

Strontium maintains Flt-1 and Flk-1 expressions

Paracrine VEGF signaling is mediated by the tyrosine kinase receptors VEGFR1 (Flt-1) and VEGFR2 (KDR/Flk-1). During adipogenesis, VEGF receptors (Flk-1 -100% Fig 6A, Flt-1 -65% Fig 6B, Nrp1 -25% $p<0.05$ Fig S1A) and partners (integrin $\beta 3$ -60%, $p<0.05$) are downregulated (Fig 6). Under osteogenic conditions, MSC presented a dramatic downregulation of Flk-1 (-100%), no effect on the Flt-1 expression and a significant upregulation of Nrp1 (+70% at D6, $p<0.05$). Concerning integrin regulation, under osteogenic conditions, $\beta 1$ and $\beta 3$ were upregulated (+65% $p<0.05$ and +55% respectively). Strontium showed activation of Flt-1 in both adipocytes and osteoblasts (until +65% and +50%, respectively). While Flk-1 disappeared in both adipocyte and osteogenic differentiations, strontium kept the amount of RNA coding for Flk-1 constant, but only under osteogenic conditions (Fig 6A and B).

Immobilization of VEGF promotes RhoA and Rac1 activations

Recombinant VEGF165 was immobilized on our collagen-coated beads (matrix-bound VEGF). VEGF measurements were performed to evaluate the quantity of matrix-bound VEGF on these beads (cf. materials and methods section), after which the cells were deposited for 1h or 4h on VEGF-coated beads prior to G-LISA measurements of RhoA-GTP and Rac1-GTP (Fig 7A). For comparison, we added the same amount of immobilized VEGF (80 μ g) in solution (Fig 7B) to cells seeded for 24 hours on non-coated beads. It was observed that immobilization

of VEGF could significantly activate both RhoA and Rac1 after 4h in our naive cells more efficiently than soluble VEGF (+40%, $p<0.001$ and +60%, $p<0.05$ respectively).

Discussion

This study confirmed that OB is repressed under simulated microgravity conditions. Many authors have reported that cytoskeletal disruption occurs in MSC during culture under simulated microgravity and spaceflight, thus contributing to the reduced osteoblastic differentiation of these cells (16, 17, 34–36). Then, a collapse of the osteoblast actin cytoskeleton and loss of focal adhesion was noted after 4 days in microgravity (34, 37). Moreover, loss of stress fibers was observed after 7 days of culture under simulated microgravity (17). Disruption of the actin cytoskeleton was attributable to a reduced RhoA activity under microgravity conditions (5, 18).

We did not observe a decrease in RhoA-GTP under our OB conditions during rotation but osteogenic markers were particularly stable indicating that osteogenesis was not stimulated during rotation. In this condition where osteogenesis is not stimulated, neither cell-associated VEGF nor soluble VEGF became induced, indicating that VEGF signaling was at least probably needed for osteogenesis as already mentioned by many authors (19–21). Interestingly, Flk-1 expression was particularly decreased during rotation under OB conditions, pointing out the potential role of this receptor in OB repression.

Nevertheless, in strontium-treated cells cultivated under OB conditions, we found that all the studied osteogenic markers were upregulated, RhoA-GTP and Rac1-GTP concentrations increased, matrix-bound VEGF was upregulated as well as Flt-1 and

Flk-1 receptors as compared to untreated cells. The ability of strontium to stimulate osteogenesis of C3H10T1/2 was in accordance with many previous reports (29, 38) but the activation of the RhoGTPases has never been reported. These data were insufficient to establish a functional link between elements but we can speculate that VEGFm signals through the RhoGTPases may sustain an osteogenic program in multipotent cells. The pioneering work of Carmeliet's group on VEGF signaling in bone established that VEGF164 can stimulate β -catenin pathways known to support osteoblastogenesis (39).

The ability of VEGF164 to bind to the extracellular matrix (ECM) of multipotent cells supports our speculation on the effect of strontium and Pierre Marie's observations that strontium acts through a RhoA-dependent process to stimulate wnt signaling (29). In accordance with our proposed hypothesis, matrix-bound VEGF signaling was characterized by its long-lasting ability explained by a cooperation of VEGFR with integrins (in particular $\beta 1$) and a modification of receptor recycling. In our case, we found that under strontium treatment only $\beta 3$ integrins were upregulated. The expression of VEGF was induced by integrin $\beta 1$ -mediated mechanical forces, which were involved in osteogenesis (40). Besides, the relationship between Flk-1 and $\beta 3$ integrin appeared to be synergistic, since Flk-1 activation induces $\beta 3$ integrin tyrosine phosphorylation, which, in turn, is crucial for VEGF-induced tyrosine phosphorylation of Flk-1 (41). These studies support the concept that matrix-bound VEGF signaling might be important in multipotent cell commitment in osteogenic conditions.

The most important information provided in this paper is the fact that activation of both

RhoA and Rac1 was associated with osteogenesis. Concerning the RhoA activity, Sema4D in osteoblasts was described to activate it, which in turn inhibited bone formation by suppressing IGF-1 signaling. This apparent discrepancy was only linked to the level of cell commitment (differentiation stage) as results obtained on uncommitted cells demonstrated that RhoA activation is mandatory for osteogenesis (13, 14). RhoA activation is responsible for fibrillogenesis of fibronectin and priming of the $\alpha 5\beta 1$ receptor is known to trigger osteogenesis in mesenchymal cells (42).

Concerning the Rac1 activity, it has been established that Rac1 activation is associated with the production of reactive oxygen species (ROS) as Rac1 is a regulatory unit of NADPH oxidase. An increase in ROS is commonly linked with adipogenesis promotion but ROS also act as signaling regulators (inhibition of phosphatases) and might trigger anti-oxidant responses in multipotent cells, activating osteogenesis. More importantly, Rac1 is known to control β -catenin nuclear translocation (43) and it is tempting to link VEGF signaling to Rac1 activation in support of Wnt/ β -catenin signaling in our Sr-treated cells. Studies performed on primary bone marrow stromal cells showed that Rac1 signaling in osteoblastic cells is required for normal bone development (44) and Rac1 regulates shear stress-driven β -catenin signaling in osteoblasts (43).

According to the aforementioned literature, the simplified view that opposes RhoA and Rac1 activities needs to be revised. In contrast to the literature that opposes RhoA and Rac1 activities locally (lamellipodia), we provide evidence that strontium is able to activate both globally. The dual activation of RhoA (for fibrillogenesis) and Rac1 for β -

catenin pathway may reveal a new way to control osteogenesis, particularly in situations where osteogenesis is impaired as under microgravity conditions. In an attempt to establish that stimulation of both RhoA and Rac1 is attributable to VEGFm, we immobilized recombinant VEGF164 and found, in untreated and uncommitted cells, that VEGFm stimulates RhoA and Rac1 more significantly than soluble VEGF.

The originality of this work resides in the comparison of adipogenesis and osteoblastogenesis in parallel experiments under simulated microgravity conditions under strontium within the same cell model. We clearly established that strontium was able to limit adipogenesis as already demonstrated in conventional 2D cultures (30, 45). We provided new data on the pathways activated by strontium to repress PPAR γ 2 and downstream-dependent genes. We identified that under adipogenic conditions, strontium also stimulated both RhoA and Rac1 activities.

In our case, adipogenesis was characterized by a decrease in RhoA activity, and an Rac1 activity that remained low.

In line with results obtained in osteogenic condition, we found that Flt-1, but not Flk-1, was upregulated in Sr-treated cells, leading to the conclusion that VEGF signaling might be altered by Sr. We speculated that under AD conditions, VEGFm might be the candidate to support the dual RhoA and Rac1 activation. Nevertheless, the VEGFm expression was dramatically upregulated under AD conditions and repressed upon Sr treatment. This apparent discrepancy could be explained by the fact that under AD conditions, VEGFR was dramatically repressed or absent, severely limiting VEGF signaling. Interestingly, under Sr treatment, an upregulation of Flt-1 and $\beta 3$ integrins

might suggest that a unique signaling took place in the uncommitted cells under Sr, supporting RhoA and Rac1 activations. Under AD+Sr conditions, as compared to OB+Sr conditions, cell-associated or matrix-bound VEGF concentrations were identical. We know that this assumption is speculative but we are convinced that the ability of Sr to maintain elevated VEGFm in the vicinity of uncommitted cells is of prime importance in determining their fate.

In our case, Flt-1 expression decreased during adipogenesis. Strontium stopped this downregulation suggesting that VEGF/Flt1 signaling was active in Sr-treated cells. This particular Flt-1 signaling has been considered very important by Naik et al., who showed a direct link between the Flt-1 function and the Wnt/ β -catenin signaling pathway (46). While Flk-1 has a nuclear translocation and is down-regulated via ubiquitination in response to VEGF-induced signaling through the JNK/c-Jun pathway, VEGF/Flt-1 signalling occurs, in contrast, through the Akt/ERK pathway to inhibit its constitutive ubiquitination and induce Flt-1 protein accumulation in endothelial cells. Moreover, inhibition of Flt-1 leads to cell death via direct disruption of the Wnt/ β -catenin survival pathway, which is necessary for osteogenesis (47). Also, Hovey et al. (48) showed that in 3T3-L1, VEGF188 is rather found in differentiation of terminal adipocytes, unlike VEGF 120 and 164 which are expressed at earlier stages. Inhibition of VEGF188 found in our strontium-treated cells could limit adipogenesis by blocking terminal differentiation.

As for GTPase activation, Liu et al. showed that Rac1 needed to be reduced to allow for adipocyte maturation (49). Activation of Rac1 in Sr-treated cells could be sufficient to block adipogenesis. Concerning the regulation of other receptors such as Nrp-1,

only VEGF120 was unable to bind to it. In our case, Nrp-1 was inhibited by strontium under all conditions. Strontium might also proceed by limiting Nrp-1 signaling. It is known that Sema3A signaling through Nrp1 activates Wnt signaling, limits adipogenesis and supports osteoblastogenesis by repressing RhoA (50). The present regulation is described on committed osteoblasts and not on uncommitted cells but, interestingly, it supports the idea that Nrp1 limitation of RhoA ceases to be possible under strontium.

All together, we provided evidence that strontium is particularly efficient for counteracting adipogenesis and activating osteogenesis in a multipotent cell model cultivated in a simulated microgravity environment. Our data support the hypothesis that strontium acts in uncommitted cells by activation of both RhoA and Rac1 GTPases. This dual activation might be able to explain many of the described effects of Sr *in vitro*, in particular its ability to sustain Wnt/ β -catenin signaling already known to be crucial in osteogenesis promotion and adipogenesis limitation. We also pointed out that Sr effects might be mediated through VEGF, in particular to its matrix-bound isoform. Manipulation of VEGF splicing (mechanical stress, pH and progesterone) might be necessary to establish that a unique VEGFm signaling dictates stem cell fate.

References

1. LeBlanc A, Schneider V, Shackelford L, West S, Oganov V, Bakulin A, Voronin L. 2000. Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 1:157–160.
2. Williams D, Kuipers A, Mukai C, Thirsk R. 2009. Acclimation during space flight: effects on human physiology. *Can. Med. Assoc. J.* 180:1317–1323.
3. Hughes-Fulford M, Lewis ML. 1996. Effects of microgravity on osteoblast growth activation. *Exp. Cell Res.* 224:103–109.

4. Hatton JP, Pooran M, Li C-F, Luzzio C, Hughes-Fulford M. 2003. A short pulse of mechanical force induces gene expression and growth in MC3T3-E1 osteoblasts via an ERK 1/2 pathway. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 18:58–66.
5. Zayzafoon M, Gathings WE, McDonald JM. 2004. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis. *Endocrinology* 145:2421–2432.
6. Vico L, Collet P, Guignandon A, Lafage-Proust M-H, Thomas T, Rehailla M, Alexandre C. 2000. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts. *The Lancet* 355:1607–1611.
7. Rodríguez JP, Montecinos L, Ríos S, Reyes P, Martínez J. 2000. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J. Cell. Biochem.* 79:557–565.
8. Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M. 2001. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2:165–171.
9. Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ. 2002. Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J. Clin. Pathol.* 55:693–698.
10. Hall A. 1998. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science* 280:2074–2075.
11. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273:245–248.
12. Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285:895–898.
13. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. 2004. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* 6:483–495.
14. Sordella R, Jiang W, Chen G-C, Curto M, Settleman J. 2003. Modulation of Rho GTPase Signaling Regulates a Switch between Adipogenesis and Myogenesis. *Cell* 113:147–158.
15. Servotte S, Zhang Z, Lambert CA, Ho TTG, Chometon G, Eckes B, Krieg T, Lapière CM, Nusgens BV, Aumailley M. 2006. Establishment of stable human fibroblast cell lines constitutively expressing active Rho-GTPases. *Protoplasma* 229:215–220.
16. Buravkova LB, Gershovich PM, Gershovich JG, Grigor'ev AI. 2010. Mechanisms of gravitational sensitivity of osteogenic precursor cells. *Acta Naturae* 2:28–36.
17. Zayzafoon M, Meyers VE, McDonald JM. 2005. Microgravity: the immune response and bone. *Immunol. Rev.* 208:267–280.
18. Meyers VE, Zayzafoon M, Douglas JT, McDonald JM. 2005. RhoA and Cytoskeletal Disruption Mediate Reduced Osteoblastogenesis and Enhanced Adipogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells in Modeled Microgravity. *J. Bone Miner. Res.* 20:1858–1866.
19. Hiltunen MO, Ruuskanen M, Huuskonen J, Mähönen AJ, Ahonen M, Rutanen J, Kosma V-M, Mahonen A, Kröger H, Ylä-Herttuala S. 2003. Adenovirus-mediated VEGF-A gene transfer induces bone formation *in vivo*. *FASEB J.*
20. Midy V, Plouet J. 1994. Vasculotropin/Vascular Endothelial Growth Factor Induces Differentiation in Cultured Osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:380–386.
21. Zelzer E, McLean W, Ng Y-S, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, D'Amore PA, Olsen BR. 2002. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 129:1893–1904.
22. Liu Y, Berendsen AD, Jia S, Lotinun S, Baron R, Ferrara N, Olsen BR. 2012. Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J. Clin. Invest.* 122:3101–3113.
23. Faure C, Vico L, Tracqui P, Laroche N, Vanden-Bossche A, Linossier M-T, Rattner A, Guignandon A. 2010. Functionalization of matrices by cyclically stretched osteoblasts through matrix targeting of VEGF. *Biomaterials* 31:6477–6484.
24. Faure C, Linossier M-T, Malaval L, Lafage-Proust M-H, Peyroche S, Vico L, Guignandon A. 2008. Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerisation. *Bone* 42:1092–1101.
25. Dumas V, Perrier A, Malaval L, Laroche N, Guignandon A, Vico L, Rattner A. 2009. The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression. *Biomaterials* 30:3279–3288.
26. Guignandon A, Faure C, Neutelings T, Rattner A, Mineur P, Linossier M-T, Laroche N, Lambert C, Deroanne C, Nusgens B, Demets R, Colige A, Vico L. 2014. Rac1 GTPase silencing counteracts microgravity-induced effects on osteoblastic cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*
27. Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Segura T, Iruela-Arispe ML. 2010. Anchorage of VEGF to the

extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J. Cell Biol.* 188:595–609.

28. Anderson SM, Shergill B, Barry ZT, Manousiouthakis E, Chen TT, Botvinick E, Platt MO, Iruela-Arispe ML, Segura T. 2011. VEGF internalization is not required for VEGFR-2 phosphorylation in bioengineered surfaces with covalently linked VEGF. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* 3:887–896.

29. Fromigué O, Haÿ E, Barbara A, Marie PJ. 2010. Essential Role of Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT)-mediated Wnt Signaling in Osteoblast Differentiation Induced by Strontium Ranelate. *J. Biol. Chem.* 285:25251–25258.

30. Fournier C, Perrier A, Thomas M, Laroche N, Dumas V, Rattner A, Vico L, Guignandon A. 2012. Reduction by strontium of the bone marrow adiposity in mice and repression of the adipogenic commitment of multipotent C3H10T1/2 cells. *Bone* 50:499–509.

31. Pollack SR, Meaney DF, Levine EM, Litt M, Johnston ED. 2000. Numerical Model and Experimental Validation of Microcarrier Motion in a Rotating Bioreactor. *Tissue Eng.* 6:519–530.

32. Shibutani T, Iwanaga H, Imai K, Kitago M, Doi Y, Iwayama Y. 2000. Use of glass slides coated with apatite–collagen complexes for measurement of osteoclastic resorption activity. *J. Biomed. Mater. Res.* 50:153–159.

33. Doi Y, Horiguchi T, Moriwaki Y, Kitago H, Kajimoto T, Iwayama Y. 1996. Formation of apatite-collagen complexes. *J. Biomed. Mater. Res.* 31:43–49.

34. Hughes-Fulford M. 2003. Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight. *Adv. Space Res. Off. J. Comm. Space Res. COSPAR* 32:1585–1593.

35. Huang Y, Dai Z-Q, Ling S-K, Zhang H-Y, Wan Y-M, Li Y-H. 2009. Gravity, a regulation factor in the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Sci.* 16:87.

36. Gershovich PM, Gershovich IG, Buravkova LB. 2009. [Cytoskeleton structures and adhesion properties of human stromal precursors under conditions of simulated microgravity]. *Tsitologiya* 51:896–904.

37. Nabavi N, Khandani A, Camirand A, Harrison RE. 2011. Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion. *Bone* 49:965–974.

38. Caverzasio J. 2008. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. *Bone* 42:1131–1136.

39. Maes C, Goossens S, Bartunkova S, Drogat B, Coenegrachts L, Stockmans I, Moermans K, Nyabi O, Haigh K, Naessens M, Haenebalcke L, Tuckermann JP, Tjwa M, Carmeliet P, Mandic V, David J-P, Behrens A, Nagy A,

Carmeliet G, Haigh JJ. 2010. Increased skeletal VEGF enhances beta-catenin activity and results in excessively ossified bones. *EMBO J.* 29:424–441.

40. Kasten A, Müller P, Bulnheim U, Groll J, Bruellhoff K, Beck U, Steinhoff G, Möller M, Rychly J. 2010. Mechanical stress and magnetic forces induce biological responses in mesenchymal stem cells which depend on environmental factors. *J. Cell. Biochem.* 111:1586–1597.

41. Mahabeleshwar GH, Feng W, Reddy K, Plow EF, Byzova TV. 2007. Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. *Circ. Res.* 101:570–580.

42. Hamidouche Z, Fromigué O, Ringe J, Häupl T, Vaudin P, Pagès J-C, Srouji S, Livne E, Marie PJ. 2009. Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:18587–18591.

43. Wan Q, Cho E, Yokota H, Na S. 2013. Rac1 and Cdc42 GTPases regulate shear stress-driven β -catenin signaling in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 433:502–507.

44. Lane SW, De Vita S, Alexander KA, Karaman R, Milsom MD, Dorrance AM, Purdon A, Louis L, Bouxsein ML, Williams DA. 2012. Rac signaling in osteoblastic cells is required for normal bone development but is dispensable for hematopoietic development. *Blood* 119:736–744.

45. Peng S, Zhou G, Luk KDK, Cheung KMC, Li Z, Lam WM, Zhou Z, Lu WW. 2009. Strontium Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Through the Ras/MAPK Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* 23:165–174.

46. Naik S, Dothager RS, Marasa J, Lewis CL, Piwnicka-Worms D. 2009. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Is Synthetic Lethal to Aberrant {beta}-Catenin Activation in Colon Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15:7529–7537.

47. Zhang Z, Neiva KG, Lingen MW, Ellis LM, Nör JE. 2010. VEGF-dependent tumor angiogenesis requires inverse and reciprocal regulation of VEGFR1 and VEGFR2. *Cell Death Differ.* 17:499–512.

48. Hovey RC, Goldhar AS, Baffi J, Vonderhaar BK. 2001. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor expression in epithelial and stromal cells during mouse mammary gland development. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 15:819–831.

49. Cristancho AG, Lazar MA. 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:722–734.

50. Hayashi M, Nakashima T, Taniguchi M, Kodama T, Kumanogoh A, Takayanagi H. 2012. Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature* 485:69–74.

FIGURE LEGENDS

Fig.1: Culture under rotating wall vessel condition affects MSC differentiation

(A) C3H10T1/2 were cultured 2 days on plastic beads or mineralized plastic beads in α MEM medium, in order to promote cell proliferation. They were then induced 2 days in differentiation media (AD or OB with or without strontium, 5-mM) prior to being cultured under simulated microgravity conditions. The extraction of aggregates was realized in order to perform Oil Red O staining (B), ALP staining (C), RT-QPCR, ELISA and G-Lisa at days 0, 2, 4, 6 and 8. Each condition was repeated three times.

Fig.2: Strontium acts as a negative regulator of adipogenesis and a positive regulator of osteogenesis

Adipogenesis markers (A) were measured by RT-qPCR during the culture (PPAR γ , C/EBP α , FABP4 and Adiponectine), and osteogenesis markers (B) (alkaline phosphatase (ALP), osterix (OSX), bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN)), in AD or OB medium, with or without strontium, 5-mM. Error bars represent s.e.m. $*p<0.05$, $**p<0.01$ and $***p<0.001$ compared to medium without Sr, or compared with conditions indicated by the horizontal bars (N = 3).

Fig.3: Strontium regulates RhoA and Rac1 activities in committed adipocytes and osteoblasts

C3H10T1/2 cells were cultured 2, 6 and 8 days in AD or OB medium and simulated microgravity, with or without 5-mM Sr. Cells were then harvested for G-LISA assays of RhoA (A) and Rac1 (B). Error bars represent s.e.m. $*p<0.05$, $**p<0.01$ and $***p<0.001$ compared to medium without Sr, or compared with conditions indicated by the horizontal bars (N = 4).

Fig.4: Differential regulations on matrix-bound and soluble VEGF by strontium

ELISA of VEGF protein was performed at days 2, 6 and 8 on culture supernatants to quantify soluble VEGF proteins as well cell/matrix-bound lysates to quantify cell-associated VEGF. Error bars represent s.e.m. $*p<0.05$, $**p<0.01$ and $***p<0.001$ compared to medium without Sr, or compared with conditions indicated by the horizontal bars (N = 3).

Fig. 5: Strontium differentially regulates VEGF188 isoform expression under OB and AD conditions

VEGF isoforms (188, 164 and 120) were measured at days 2, 6 and 8 by RT-qPCR during the cultures in AD or OB medium, with or without strontium, 5-mM. Error bars represent s.e.m. $*p<0.05$ and $**p<0.01$ compared to medium without Sr (N = 3).

Fig. 6: Strontium maintains Flt-1 and Flk-1 expressions

VEGF receptors 1 (Flt-1) and 2 (Flk-1) were measured at days 2, 6 and 8 by RT-qPCR during the cultures in AD or OB medium, with or without strontium, 5-mM. Error bars represent s.e.m. $*p<0.05$ compared to medium without Sr (N = 3).

Fig. 7: Immobilization of VEGF promotes RhoA and Rac1 activations

C3H10T1/2 were seeded for 1h and 4h on beads coated with recombinant VEGF164 before G-LISA measurements of RhoA-GTP and Rac1-GTP. For soluble VEGF, cells were seeded for 24 hours on non-coated beads, VEGF164 was added in solution and then G-Lisa was performed for RhoA and Rac1 after 1h and 4h. Error bars represent s.e.m. $*p<0.05$ and $***p<0.001$ compared to VEGFm (N = 6).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Fig. S1: Strontium regulation of neuropilin-1, integrin β 1 and β 3 expressions

Neuropilin-1 (A) was measured by RT-qPCR during the culture, integrin β 1 (B) and β 3

(C), in AD or OB medium, with or without strontium, 5-mM. Error bars represent s.e.m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to medium without Sr, or compared with conditions indicated by the horizontal bars (N = 3).

TABLE

Genes	Forward	Reverse
β- Actine NM_007393.3	cctctatgccaacacagtgc	tctgctggaaggtggacagt
PPARγ2 NM_001127330.1	tccgtgatggaagaccactc	ccacagactcggcactcaat
FABP4 NM_024406	ggaacctggaagcttgctc	ttcctgtcgtctcggtgat
C/EBPα NM_007678.3	caagccaggactaggagatt	ccaaggcacaaggttacttc
Adiponectin NM_009605	gtgatggcagagatggcact	cacataagcggcttctccag
Leptin NM_008493.3	tgttcaagcagtgcctatcc	ctccaggtcattggctatct
RunX2 NM_009820.4	ccgggaatgatgagaactac	tgtctgtgccttcttggttc
Osx ou Sp7 NM_130458.3	atggcgtcctctctgcttg	aaggtcagcgtatggcttct
COL 1α NM_007742.3	caccctcaagagcctgagtc	ttaggcgcaggaaggtcagc
BSP NM_008318.3	acaatccgtgccactcactc	ggaactatcgccgtctccat
OPN NM_009263.2	cccgggtgaaagtgactgattc	atggctttcattggaattgc
VEGF-A NM_001025250.3	tgtctaccagcgaagctact	tgctgtaggaagctcatctc
Flt-1 NM_010228.3	gcacattggtggtgctgac	cttccttcggctggcatct
FLK-1 NM_010612.2	gcggagacgctcttcataat	cacttgctggcatcataagg
VEGF 188	catgcggatcaaacctca	ctccaggatttaaacggga
VEGF 164	catgcggatcaaacct	cacagtgattttctggct
VEGF 120	catgcggatcaaacct	gtcacattttctggct
Nrp-1 NM_008737.2	agcaagcgcaaggctaagtc	tggtcgtgctcacactcatc
β1 Integrin NM_010578.2	ggaggaatgtaacacgactg	ccactgctgacttaggaatc
β3 Integrin NM_016780.2	tgtggtggaagagcctgagt	gtcctggcgtcatctgaag

Table 1. Primer sequences

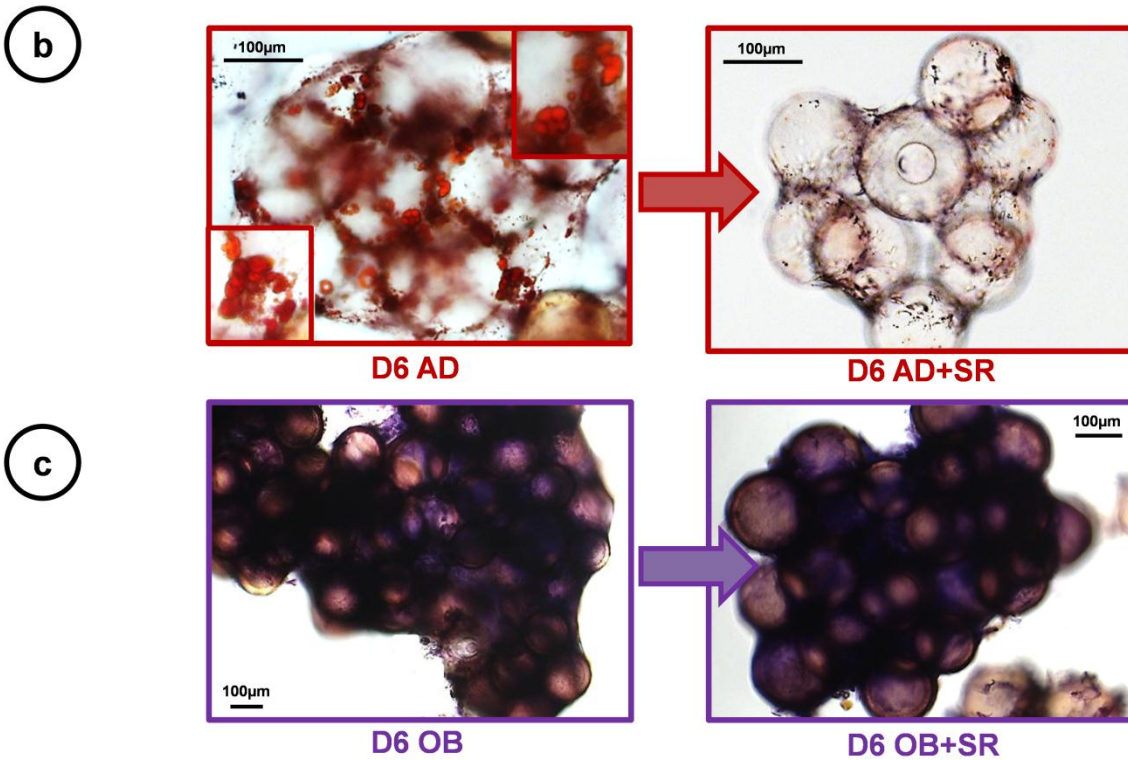
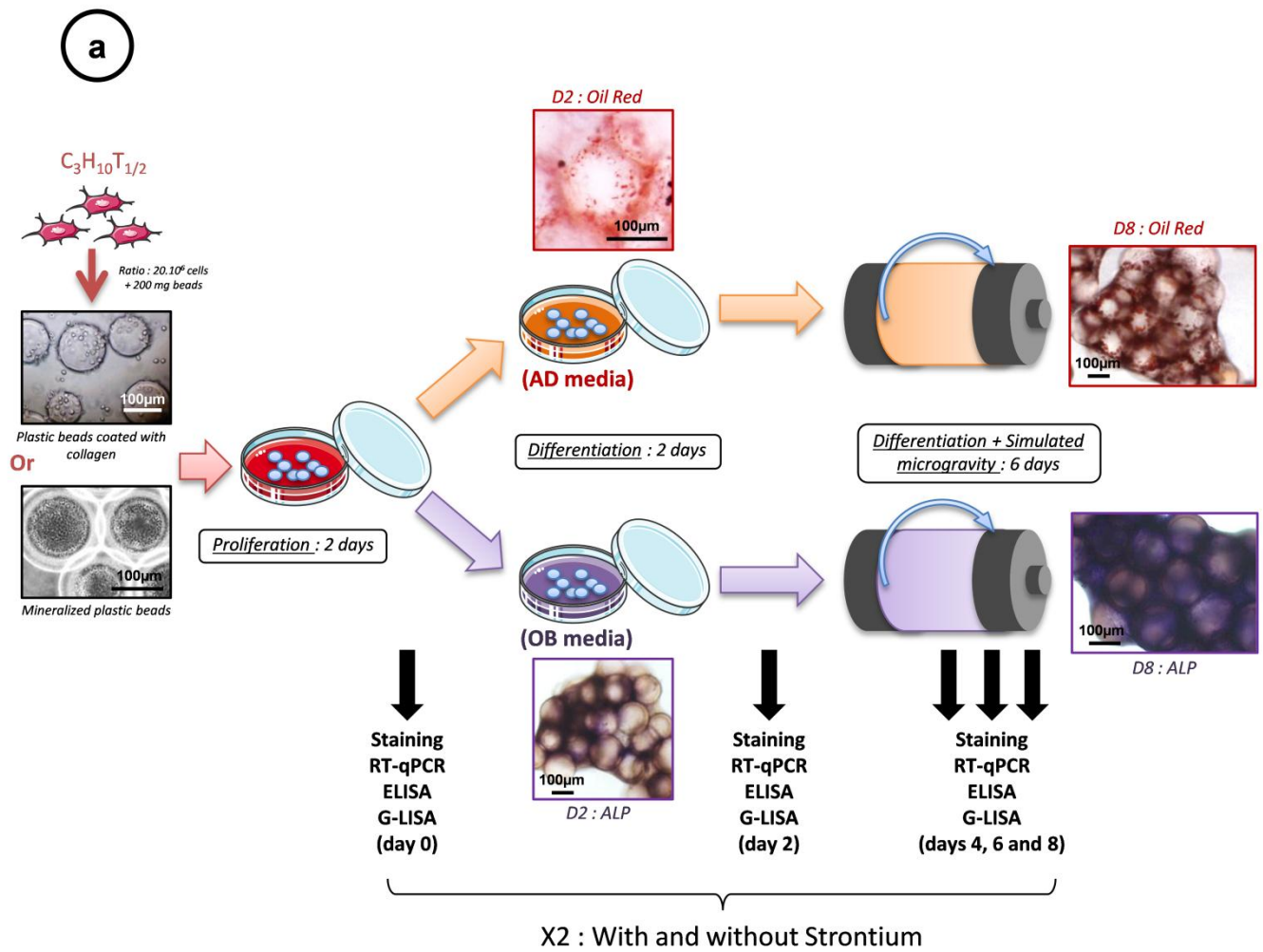


Fig. 1 LOUIS et al.

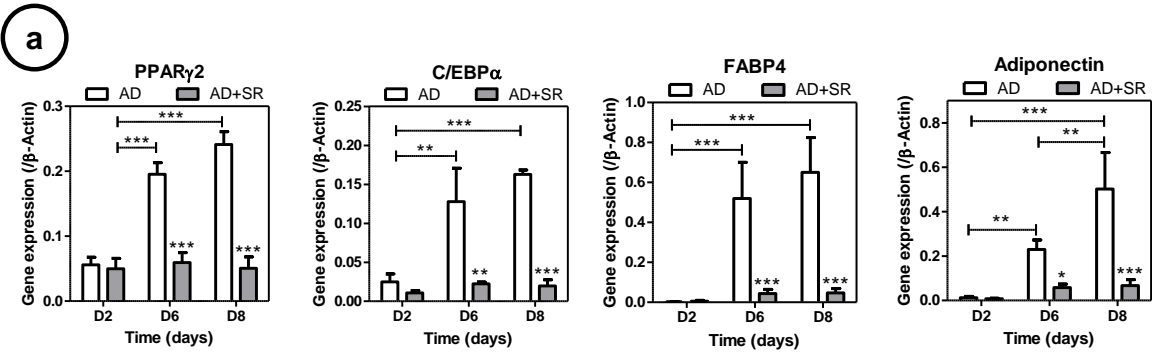


Fig. 2 LOUIS et al.

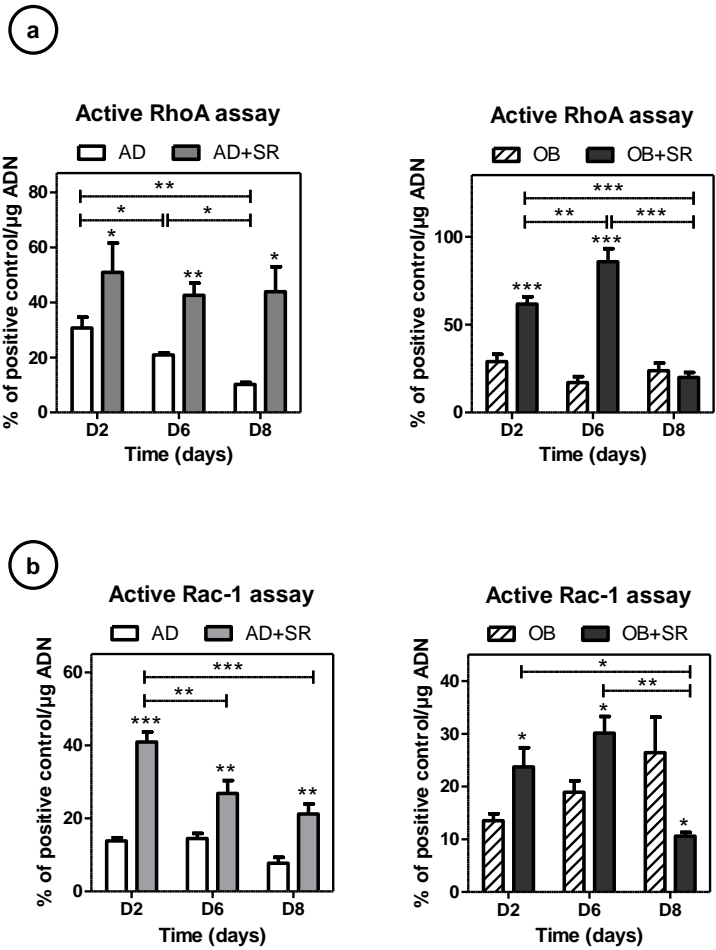
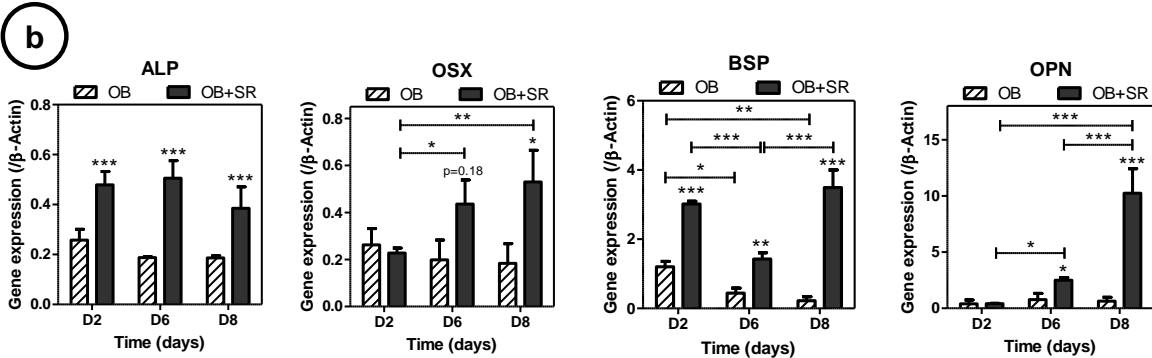


Fig. 3 LOUIS et al.

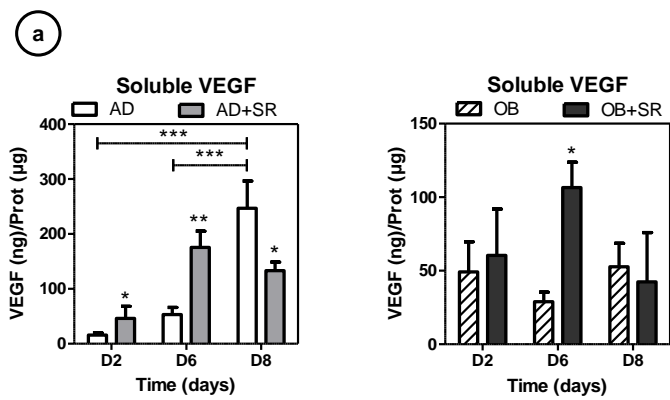


Fig. 4 LOUIS et al.

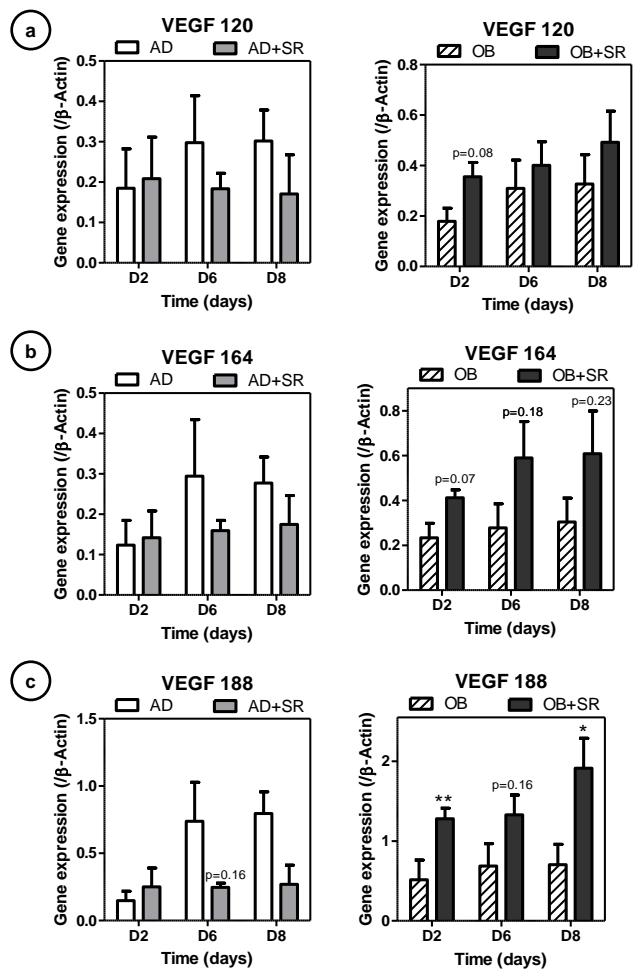
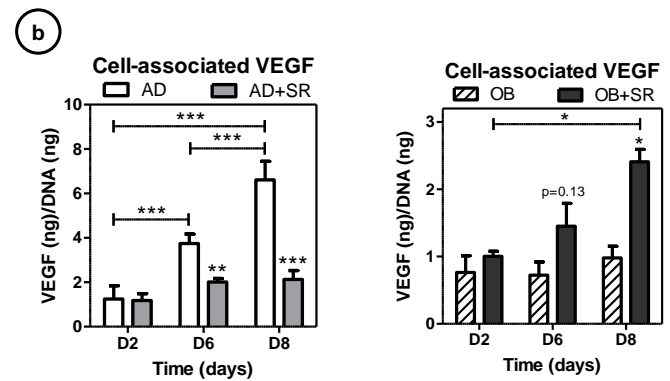


Fig. 5 LOUIS et al.

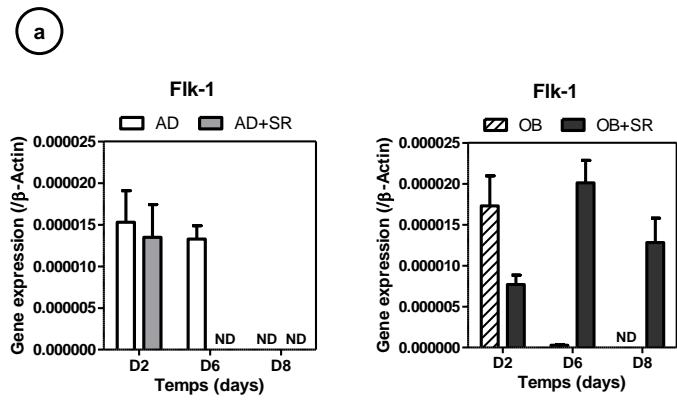


Fig. 6 LOUIS et al.

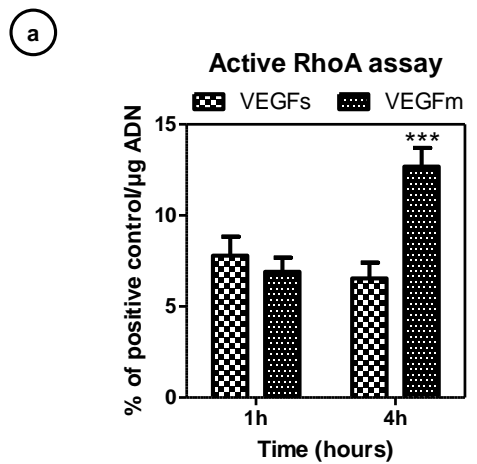
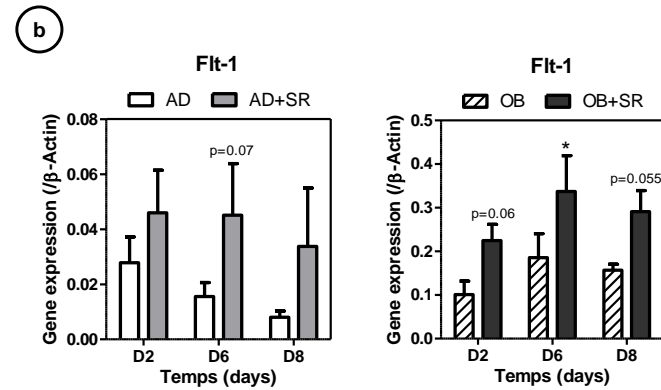
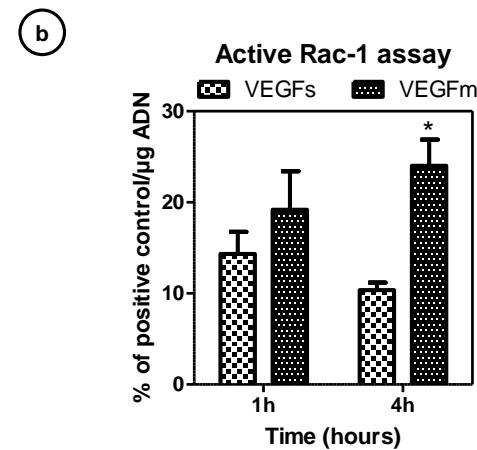
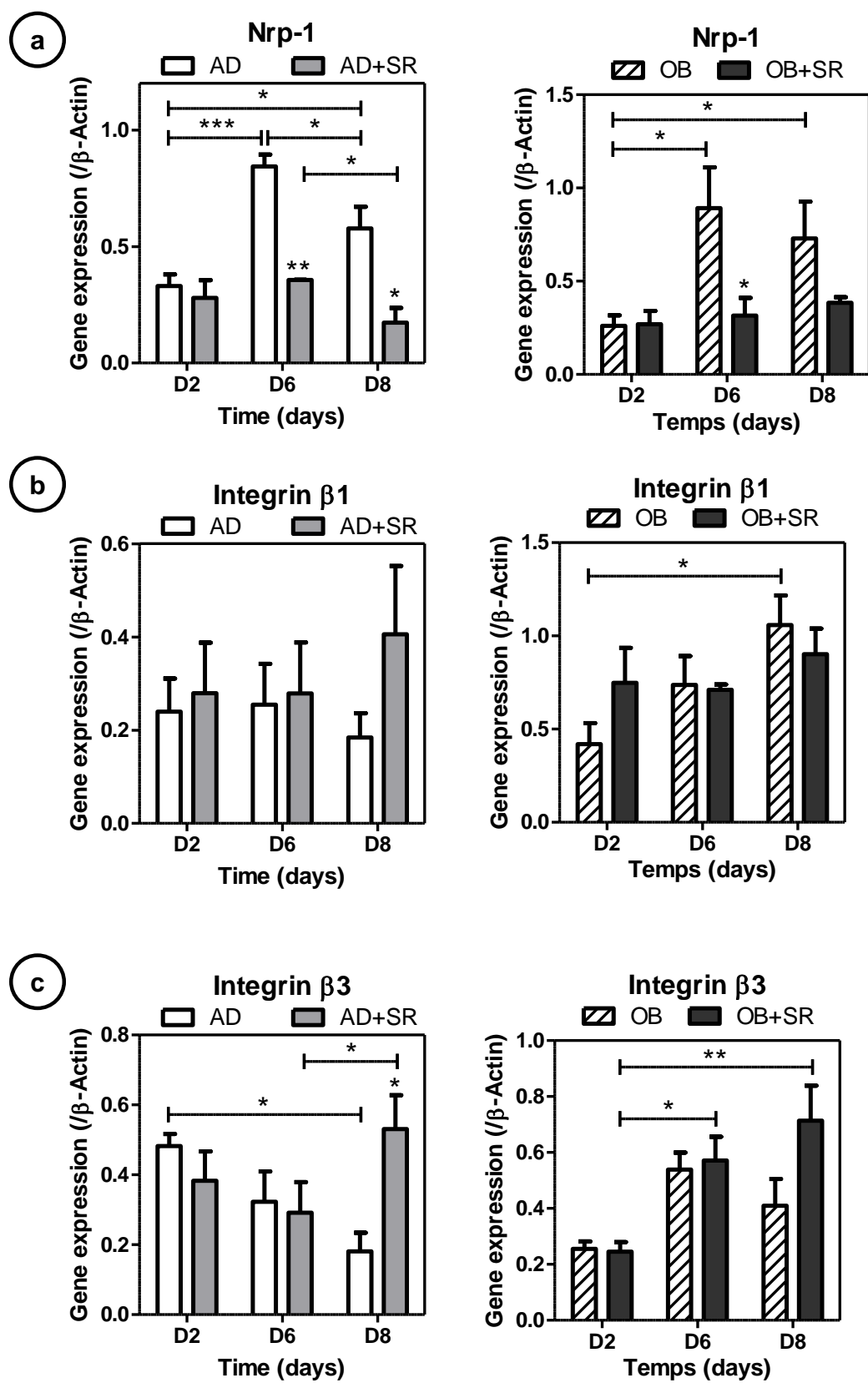


Fig. 7 LOUIS et al.



*Supp. Fig. S1 LOUIS et al.*

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Ces résultats mettent en avant d'une part l'induction de l'adipogénèse en impesanteur simulée, et d'autre part la limitation de l'ostéogénèse. Le strontium permet cependant de réduire cette limitation en induisant la différenciation ostéoblastique par le biais des RhoGTPases. Ce milieu OB+Sr peut être donc considéré comme un milieu ostéoinducteur efficace. Dans cet article, le temps D0, juste avant l'induction en milieux ostéogénique ou adipocytaire n'était pas représenté. La cinétique complète des GTPases RhoA et Rac1 permet de mieux comprendre leur implication dans les deux types de différenciation (AD et OB+Sr) (Figure 69).

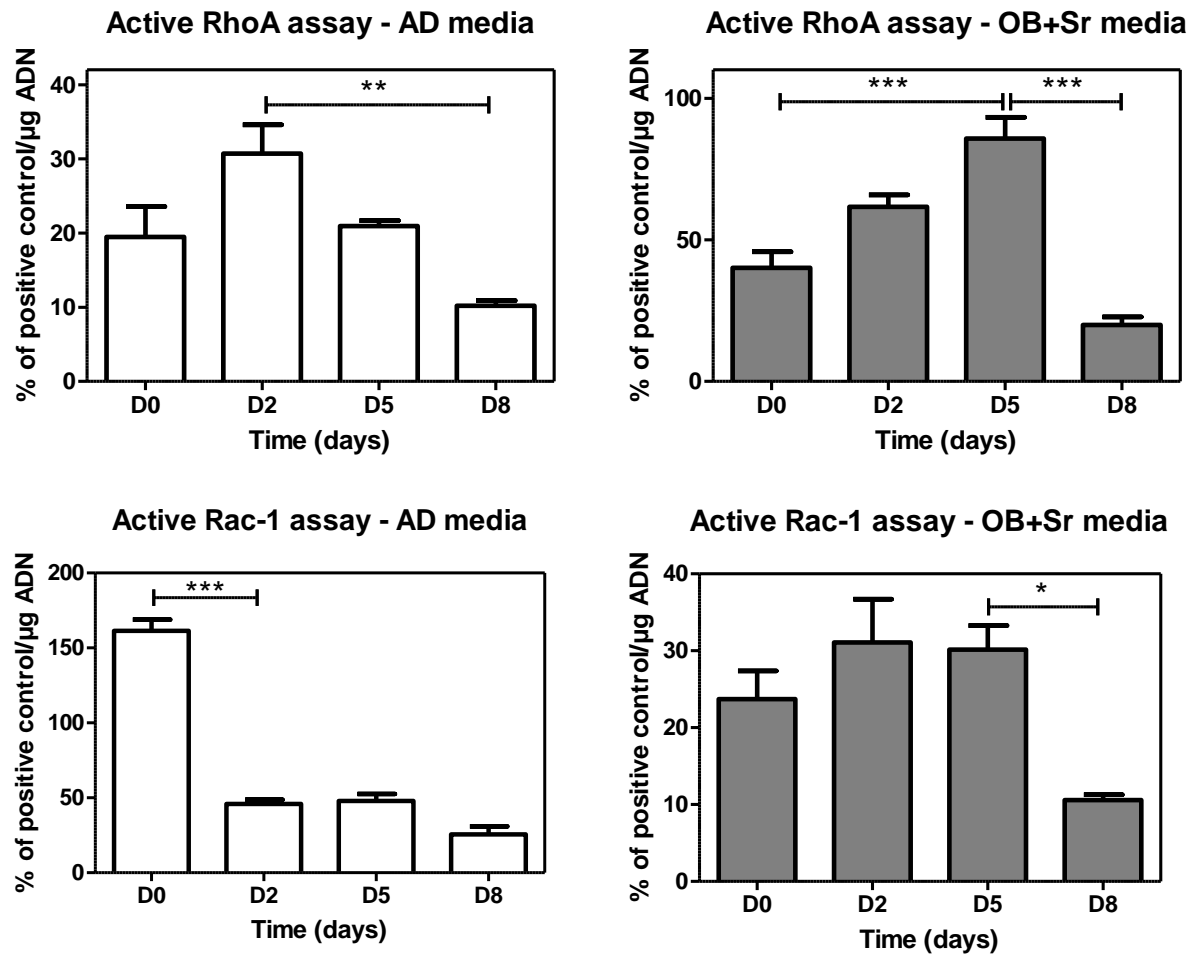


FIGURE 69 : ACTIVITE DES GTPASES RHOA ET RAC1 AU COURS DES DIFFERENCIATIONS AD ET OB+SR C3H10T1/2 ensemencées sur billes de plastique collégénées ou sur billes minéralisées, mis en culture à D2 dans le RWV. Les formes GTP de RhoA et Rac1 sont dosées par G-Lisa à 0, 2, 5 et 8 jours de cultures. Barres d'écart à la moyenne, Anova 2 voies, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ (N=4).

Les données présentes dans la littérature montrent souvent RhoA qui permet l'ostéogénèse et inhibe l'adipogénèse, mais peu de données sont connues sur Rac1, excepté qu'il inhibe la différenciation terminale des adipocytes (Cristancho et Lazar 2011).

Lors de l'adipogénèse, l'activité de RhoA a tendance à augmenter en tout début d'induction puis à diminuer significativement ensuite (-70%, $p < 0.01$) pour permettre la différenciation en adipocytes des C3H10T1/2. Cette répression de RhoA était connue, mais pas sa légère induction lors de l'engagement, qui peut expliquer la limitation de l'adipogénèse observée dans l'article 1 lorsque RhoA est inhibé par la C3 transférase avant l'engagement cellulaire. RhoA serait donc nécessaire pour

amorcer l'engagement des cellules multipotentes. De la même façon, cette tendance à l'induction se retrouve lors de l'engagement des ostéoblastes, mais pour Rac1, qui voit ensuite son activité diminuer entre D6 et D8.

En parallèle, Rac1 est très fortement réprimé lors dès l'engagement des adipocytes, comme déjà montré par Cristancho et coll., et reste faible ensuite, tandis que l'ostéogénèse a tendance à l'induire. Rac1 apparaît donc comme étant tout aussi nécessaire dans l'équilibre ostéo/adipogénèse des cellules multipotentes, de même que RhoA, son inhibition permettant l'adipogénèse et son induction intervenant dans l'ostéoblastogénèse.

RhoA est en effet induit de façon très significative (+50%, $p < 0.001$) au cours de l'ostéogénèse, comme déjà montré par plusieurs équipes (McBeath et al. 2004; Sordella et al. 2003). Cependant, à D8 cette induction est brusquement inhibée (-75%, $p < 0.001$). Cette soudaine limitation de RhoA peut être expliquée par le fait que les C3H10T1/2, en présence de strontium, ont fini leur période d'engagement et entrent à présent en phase de maturation de l'ostéoblaste (synthèse de collagène, puis minéralisation). En effet, chez les ostéoblastes déjà engagés, la surexpression de RhoA a plutôt été montrée comme limitant leur différenciation en supprimant la signalisation de l'IGF-1 par exemple (Negishi-Koga et al. 2011). Il existe donc une cinétique particulière de RhoA. Il est d'abord induit pour permettre l'engagement des précurseurs ostéoblastiques, et la fibrillogénèse de la fibronectine grâce aux intégrines (Hamidouche et al. 2009). Puis son activité est limitée lors de la maturation des ostéoblastes.

Rac1 semble montrer la même régulation particulière, étant d'abord induit lors de l'engagement des ostéoblastes, puis réduit fortement (-65%, $p < 0.05$) à D8. Rac1 est impliqué dans la translocation de la β -caténine au noyau, nécessaire à l'ostéogénèse (Wan et al. 2013). De même que pour RhoA, cette signalisation ne serait nécessaire seulement en début de différenciation, une forte activité de Rac1 ensuite inhibant la maturation des ostéoblastes, de la même façon qu'Onishi et coll. activent l'ostéogénèse en inhibant Rac1 (Onishi et al. 2013). Gao et coll. (Gao, McBeath, et Chen 2010) avaient aussi constaté que l'activité de Rac1 était significativement plus élevée dans les cellules bien étalées au début de l'ostéoblastogénèse que plus tard, lorsqu'elles sont à haute densité.

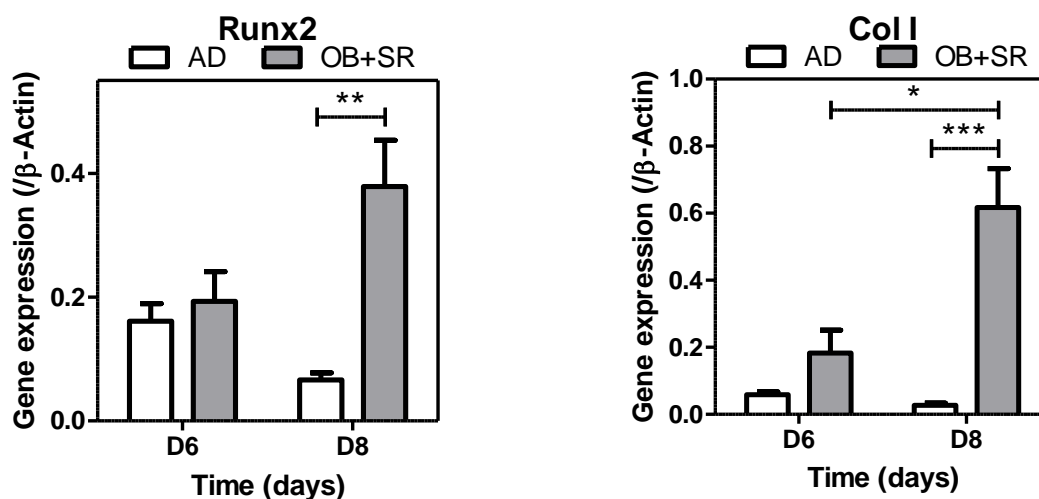


FIGURE 70 : EXPRESSION DES GENES RUNX2 ET COL I EN DIFFERENCIATIONS AD ET OB+SR C3H10T1/2 ensemencées sur billes de plastique collégénées ou sur billes minéralisées, mis en culture à D2 dans le RWV. RT-qPCR réalisée à D6 et D8 de cultures. Barres d'écart à la moyenne, Anova 2 voies, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ (N=3).

Cette hypothèse est renforcée par le fait que le facteur de transcription ostéogénique Runx2 n'est réellement fortement induit qu'à D8, ainsi que le collagène de type I, montrant que les ostéoblastes ont fini leur phase d'engagement au bout de 8 jours d'induction.

Finalement deux cinétiques particulières des RhoGTPases se dessinent :

- Lors de l'ostéogénèse, l'engagement nécessite l'activation des deux GTPases RhoA et Rac1 dont l'activité sera ensuite limitée lors de la maturation,
- L'adipogénèse montre une courte induction de RhoA qui sera ensuite très inhibé de même que Rac1 pour permettre la différenciation adipocytaire.

CONCLUSION

En conclusion, nous pouvons proposer trois types de mécanismes d'action du strontium, qui diffèrent en fonction du niveau d'engagement des cellules souches squelettiques.

Dans le cas de **cellules indifférenciées**, le strontium active rapidement (dès 20 mins, données non montrées) les deux GTPases RhoA et Rac1. Cette double activation stimule la production de matrice extra-cellulaire et renforce la tension intracellulaire, amenant progressivement à une répression de l'adipogénèse et à une induction de l'ostéogénèse, notamment par les voies Wnt (Figure 71A).

En **conditions ostéogéniques**, lorsque les cellules se sont engagées dans la voie ostéoblastique, le strontium n'active plus les deux GTPases RhoA et Rac1 (8 jours d'induction), la tension intracellulaire étant suffisante. Les voies de signalisation stimulées par le strontium changent en faveur de la voie du VEGF matriciel. Ce dernier est induit et produit de plus en plus dans la matrice extra-cellulaire. A son contact, les pré-ostéoblastes vont l'internaliser préférentiellement par le biais du récepteur Flt-1, fortement induit par le strontium, mais aussi par Flk-1. Cette signalisation permet la maturation ostéoblastique en activant les voies Wnt canoniques (translocation de la β -caténine) et non-canoniques (Wnt 5a) (Figure 71B).

Finalement, dans le cas de cellules en **conditions adipogéniques**, le strontium continue d'induire RhoA et Rac1 (même 8 jours d'induction), renforçant de plus en plus la tension intracellulaire. De plus, cette forte activité des deux GTPases empêche l'engagement en pré-adipocytes, comme vu précédemment. Même si le récepteur Flt-1 est induit sous strontium, la répression des deux types de VEGF, solubles et matriciels, empêche sa signalisation. Les cellules restent en grande majorité indifférenciées, réprimant l'adipogénèse (Figure 71C).

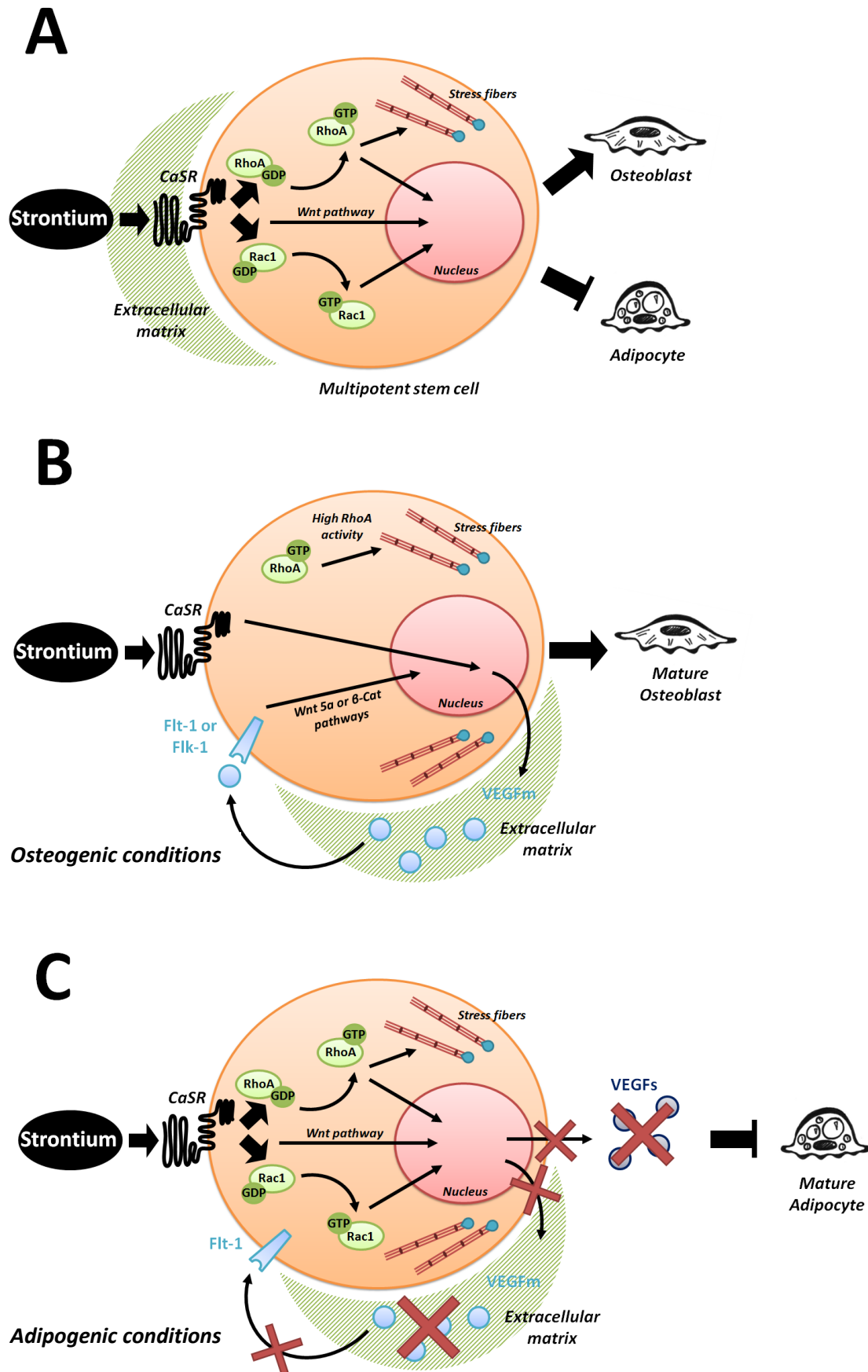


FIGURE 71 : SYNTHESE DES MECANISMES D'ACTION DU STRONTIUM SELON L'ENGAGEMENTS DES CSS
A : cellules indifférenciées, B : conditions ostéogéniques, C : conditions adipogéniques



CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALE

L'ensemble de nos résultats nous aura permis de mettre en évidence l'efficacité du strontium dans sa capacité à bloquer l'adipogénèse et à stimuler l'ostéogénèse. Cette capacité était déjà décrite dans un contexte « normo-gravitaire » mais pas dans un contexte d'impesanteur simulée. Cette validation est extrêmement importante puisque nous l'attendions pour la proposer aux agences spatiales (vol programmé en 2016) comme contremesure.

L'identification de contre mesure efficace *in vitro* en impesanteur est une étape clé dans la compréhension des mécanismes qui peuvent mimer les effets des contraintes mécaniques. En effet il est connu depuis fort longtemps que les contraintes mécaniques stimulent l'augmentation intracellulaire du calcium. Si des molécules comme le strontium peuvent stimuler une telle augmentation (en utilisant des canaux calciques, via la signalisation du CaSR ou du GPRC6 (récepteur de l'ostéocalcine)) il est tentant de le proposer comme mécanomimétique. Cette proposition amène la question de savoir pourquoi le calcium ne serait-il pas un bon candidat au mécanomimétisme ? Il n'y a à notre connaissance aucune donnée qui permettent de rejeter sa candidature. La dissolution de certains biomatériaux à base de phosphate de calcium les rend particulièrement bioactifs car la concentration locale de calcium et de phosphate augmente. Au-delà du mimétisme des contraintes mécaniques, l'augmentation intracellulaire de calcium est connue pour inhiber l'adipogénèse ce qui permet de penser à un mécanisme similaire pour le strontium (augmentation intracellulaire de Sr^{2+}).

La combinaison de "billes 3D collagénées + dépôt par précipitation d'apatite carbonatée + strontium" se trouve être la meilleure combinaison ostéogénique que nous avons jamais testée au laboratoire avec les C3H10T1/2 (fibroblastes embryonnaires) en culture ostéogénique (acide ascorbique + β -glycérophosphate + acide rétinolique). En effet ces cellules ne sont pas des ostéoprogéniteurs et ne font pas ou peu de différenciation sous acide ascorbique et β -glycérophosphate seuls, condition classique pour des cellules déjà engagés (*notamment des ostéoblastes primaires de calvaria, modèle de référence du laboratoire*). Nous proposons donc d'associer des minéraux d'apatite et du strontium dans nos modèles de différenciation ostéogénique pour des cellules multipotentes. De plus, de façon intéressante, l'acide ascorbique est très fortement pro-adipogénique chez des cellules multipotentes comme les C3H10 T1/2 alors que cela ne s'observe jamais avec des cellules déjà engagées ! Il serait donc très intéressant aussi pour les milieux utilisés dans nos futures missions spatiales que l'acide ascorbique et le β -glycérophosphate soient retirés au profit de minéraux dans un milieu contenant du strontium. Nos deux futures missions spatiales utiliseront des C3H10T1/2 et des cellules multipotentes de périoste de souris (*collaboration avec le Dr Geert Carmeliet, KU Leuven*) pour lesquelles les résultats de cette thèse sont fondamentaux.

Dans la compréhension des mécanismes moléculaires du strontium sur des cellules multipotentes, nous avons confirmé quelques pistes intéressantes et suggéré des régulations inédites.

Nous avons confirmé le rôle important de la GTPase RhoA dans les effets cellulaires du strontium. Pierre Marie et son équipe avait déjà montré que le silencing de RhoA bloquait l'action du strontium mais aucune mesure de son activité sous strontium n'avait été trouvée. Nous avons de plus établi un lien entre la production d'ERO et l'activation ou l'activité des RhoGTPases, sous strontium, ce qui n'était pas démontré. L'implication de Nrf2 dans les réponses antioxydantes sous strontium est aussi originale puisqu'il a été déjà démontré le rôle de RhoA comme contrôleur de cette voie.

Il semble logique que l'intégrité du cytosquelette, dépendante des RhoGTPases soit liée à des systèmes anti-stress pour la cellule. Car si le cytosquelette est intact, Nrf2 est pris en charge par Keap1 et adressé au protéasome après son ubiquitination. En revanche, si le cytosquelette perd son intégrité (stress oxydant mécanique), cette dégradation est ralentie et Nrf2 peut-être phosphorylé, déclenchant une réponse anti-oxydante lors de sa translocation nucléaire. Se pose ainsi à nouveau la question de savoir si l'exposition au strontium provoque un stress à la cellule. La réponse est assurément OUI, lors

de l'exposition au strontium, le taux intracellulaire de calcium monte et ce signal déstabilise les filaments d'actine, provoquant une stimulation forte de RhoA qui va stabiliser les filaments désorganisés en rétablissant la tension intracellulaire. Cette voie directe d'activation entre le calcium et RhoA est connue (Lumetti et al. 2014), mais n'explique probablement pas les activations à plus long termes que nous décrivons dans nos expériences notamment en 3D.

La signalisation à plus long terme que nous avons choisi d'étudier plus précisément est celle du VEGF pour les raisons suivantes :

- il stimule l'ostéogénèse (Hiltunen et al. 2003; Midy et Plouet 1994; Zelzer et al. 2002) ;
- sa localisation est nucléaire chez les ostéoblastes et cytoplasmique chez les adipocytes (Yanqiu Liu et al. 2012) ;
- les isoformes du VEGF sont régulées différemment en fonction des stress mécaniques ou de l'absence de gravité (Faure et al. 2010; Faure et al. 2008; Dumas et al. 2009; Alain Guignandon et al. 2014) ;
- la signalisation de ces isoformes contrôle des mécanismes intracellulaires distincts (T. T. Chen et al. 2010; Anderson et al. 2011) ;
- ces mécanismes sont en interaction avec les RhoGTPases (Boer et al. 2004; Bryan et al. 2010; Nan Wang et al. 2013);
- le strontium a déjà été montré comme pouvant activer le VEGF, induisant les différenciations ostéoblastique et angiogénique (Choudhary et al. 2007; Gu et al. 2013).

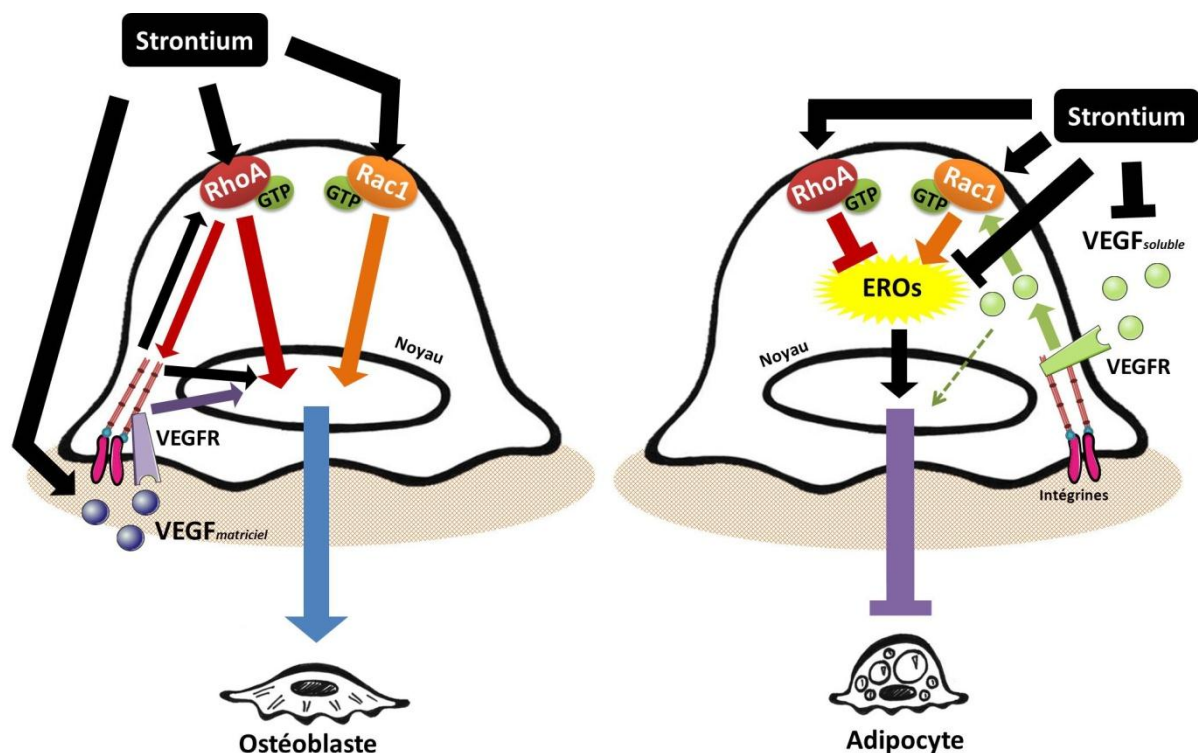


FIGURE 72 : REGULATIONS DE L'ENGAGEMENT DES CSS PAR LE STRONTIUM SUR LES VOIES DE SIGNALISATION DES GTPASES ET DU VEGF

Le strontium, en induisant la forme matricielle du VEGF chez les ostéoblastes, ainsi que l'expression de Flt-1 et Flk-1 renforce l'idée qu'une signalisation particulière autour du VEGFm pourrait expliquer l'activation des GTPases (Figure 72). Nous avons été très surpris de trouver des activations concomitantes de RhoA et de Rac1 dans nos études 2D et 3D sous strontium. En effet ces 2 GTPases sont fréquemment opposées avec une capacité à s'inhiber l'une l'autre bien établie. Si localement aux sites des contacts focaux, filopodes ou lamellipodes, des inhibitions sont décrites, rien n'empêche nos dosages globaux de leur activité d'être représentatifs de l'ensemble des carrefours métaboliques qui aboutissent à RhoA et Rac1. De nombreuses études montrent que Rac1 serait indispensable à l'ostéogénèse (translocation de la β -caténine) et de nombreux papiers montrent l'implication de RhoA dans la mise en place d'une matrice de fibronectine indispensable à l'établissement d'une matrice collagénique ostéogénique (Danen et al. 2002). Ainsi il semble logique d'associer une activation de RhoA et de Rac1 pour promouvoir l'ostéogénèse chez des cellules multipotentes. Cette association n'est cependant jamais évoquée dans la littérature et explique probablement des résultats contradictoires observés en activant ou en inhibant une seule de ces 2 GTPases.

La double stimulation (RhoA et Rac1) est potentiellement associée à la présence de matrice extracellulaire de VEGFm, et de récepteur au VEGF, préférentiellement Flt-1. Nous apportons une preuve de concept de cette double stimulation par VEGFm dans nos expériences de dépôt quantifiés de VEGF sur nos billes avant contact cellulaire. Cette expérience montre aussi que le délai pour obtenir cette double stimulation est assez long (4 heures minimum). Il est tout à fait possible que la signalisation du VEGFm passe donc par une production d'autres facteurs de signalisation. En effet, la double stimulation de RhoA et de Rac1 est classiquement retrouvée sous Wnt5a lors d'activation des voies non canoniques de Wnt (Saidak et al. 2012). Frizzled, en association avec les récepteurs Ror1 ou Ror2 permet d'activer RhoA, Rac1 et les signaux dépendant de JNK. Cette voie est aussi activée par le calcium et la calcineurine renforçant l'idée d'une activation par le strontium (von Maltzahn et al. 2012) (Figure 73).

Dans les mécanismes moléculaires expliquant la production de Wnt5a, nous proposons que Flt-1 joue un rôle très important car il a été montré qu'il contrôle positivement la voie Wnt/ β -caténine (par les récepteurs LRP6 et Frizzled). La signalisation du complexe VEGF/Flt-1 passe par la voie Akt/ERK et active l'expression puis l'accumulation du récepteur Flt-1 (Naik et al. 2009). Cette voie permet d'augmenter la survie cellulaire tout en activant la signalisation de la β -caténine, importante dans l'ostéogénèse (Z. Zhang et al. 2010). Il est donc possible que la signalisation VEGFm/Flt-1 fonctionne en synergie avec les voies de signalisation Wnt (Figure 73).

L'ensemble de nos données en différenciation ostéoblastique/adipogénique avec et sans strontium indique que l'expression de Flt-1 suit parfaitement et de façon positive les activités de RhoA et Rac1. Ce n'est pas toujours le cas pour le VEGFm, VEGFs, Flk-1. Dans ces conditions il sera primordial de connaître la localisation, l'expression des variants membranaires ou solubles de ce récepteur afin de conclure quant à son action précise sur la destinée des cellules souches.

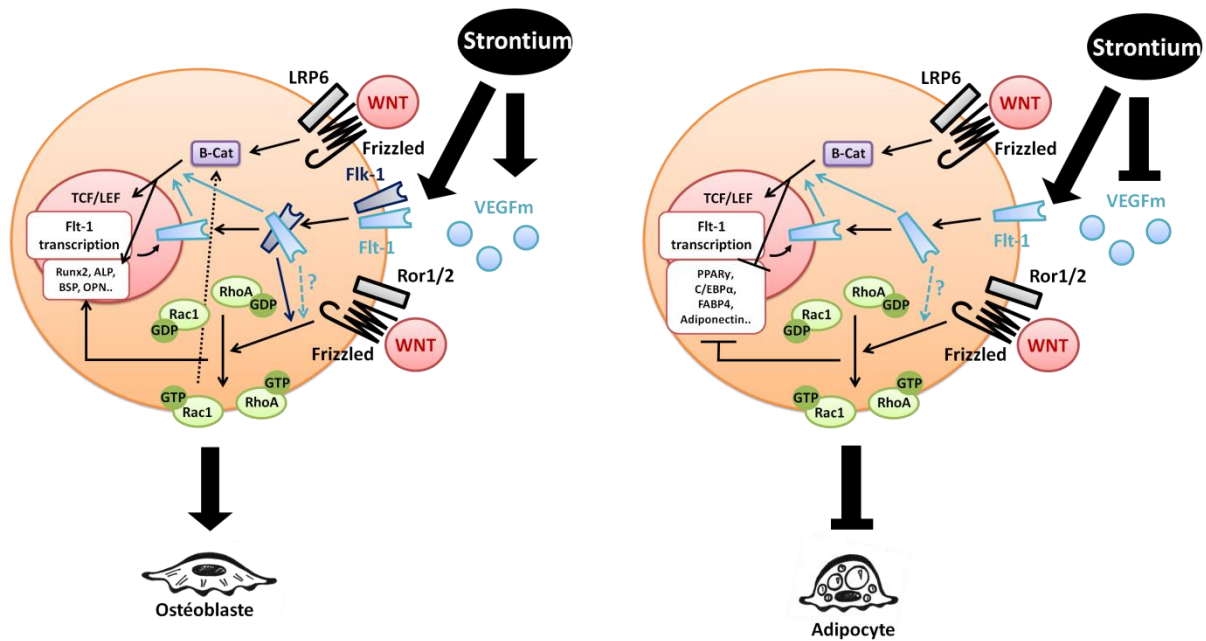


FIGURE 73 : L'ACTION DU STRONTIUM PAR LE BIAIS DES VOIES WNT CANONIQUES ET NON-CANONIQUES

Concernant l'adipogénèse et son inhibition par le strontium, nous fûmes les premiers à identifier PPAR γ 2 comme cible privilégiée. Dans notre modèle, l'adipogénèse s'accompagne d'une forte répression de Rac1 et de RhoA, on comprend aisément qu'en stimulant ces 2 GTPases sous strontium, on bloque très efficacement toute adipogénèse. Le métabolisme de l'adipocyte génère d'importantes quantités d'ERO qui activent la transactivation de PPAR γ , mais l'action précoce de RhoA sur Nrf2 bloque l'augmentation d'ERO nécessaire à l'induction de l'adipogénèse. Il n'est pas évident de présenter la stimulation de Rac1 comme un élément péjoratif pour l'adipogénèse, sachant son association avec la NOX dans la génération des ERO. Nous pouvons donc conclure que la seule activation de RhoA peut suffire à l'inhibition de l'adipogénèse et que la double activation de RhoA et Rac1 est nécessaire à l'ostéogénèse.

Une de nos hypothèses de travail était que les altérations mécaniques des cellules souches modulent le splicing du VEGF car nous avons montré une augmentation de VEGFm sous contrainte (Faure et al. 2010; Faure et al. 2008; Dumas et al. 2009) et une diminution en impesanteur (Alain Guignandon et al. 2014). Nous étions tentés par l'association d'une signalisation du VEGF matriciel avec RhoA et du VEGF soluble avec Rac1 mais nos résultats montrent des associations beaucoup plus complexes.

Pour tenter de relier nos résultats à l'hypothèse très novatrice de Olsen sur la signalisation intracrine du VEGF qui seule conditionne la destinée de cellules souches, nous pouvons avancer les hypothèses suivantes : nous montrons d'importants marquage intra-nucléaire du VEGF et des récepteurs en condition OB associé à une importante production de VEGFm/RhoA, Rac1. Il est donc possible que l'immobilisation des récepteurs du VEGF associé à des intégrines, la matrice de fibronectine ou des protéoglycanes, réduisent considérablement le trafic du VEGF et de ses récepteurs mais activent une signalisation sur du long terme par rapport à des récepteurs qui lient le VEGF soluble. La signalisation « long term » pourrait impacter sur la distribution intracellulaire du VEGF et ses récepteurs et expliquer l'adressage nucléaire sous conditions osteogéniques. A l'inverse en situation adipogénique, dans nos mains, les récepteurs du VEGF diminuent fortement et en l'absence de matrice, la production de VEGFm qui augmente pourtant ne peut qu'induire une signalisation « short term » de

VEGF soluble pour lequel le recyclage des récepteurs est peut être très rapide. Dans ces conditions, nous détectons une importante quantité de VEGF et récepteurs en intracellulaire mais pas ou peu au noyau. Rac1 intervient dans le trafic vésiculaire, une activité importante de Rac1 par la signalisation de VEGF soluble pourrait expliquer que toute la synthèse de VEGF et de ses récepteurs soit sécrétée à l'inverse lors de l'ostéoblastogénèse, l'immobilisation de VEGFR à la membrane par VEGFm activerait RhoA, la stabilisation du cytosquelette, la réduction de la sécrétion de VEGF et ses récepteurs au profit d'un trafic vers le noyau. Afin de confirmer ces liens, le double silencing de RhoA et de Rac1 pourrait permettre de répondre à ses questions fondamentales.

Nous pouvons poser tout de même l'hypothèse d'une régulation par le strontium qui diffère en fonction du niveau d'engagement des cellules. L'activation des deux GTPases RhoA et Rac1, renforce la tension intracellulaire, et participe à la répression de l'adipogénèse, même à 8 jours d'induction. En conditions ostéogéniques, cette signalisation s'inverse lorsque les pré-ostéoblastes sont déjà bien engagés, pour une activation des voies du VEGF matriciel et de ses récepteurs Flt-1 et Flk-1, induisant les voies Wnt canoniques (translocation de la β -caténine) et non-canoniques (Wnt 5a).

Dans une tentative de résumé des actions du strontium sur nos cellules souches indifférenciées, nous proposons que le strontium module très rapidement la concentration intracellulaire de calcium, qui explique les altérations du cytosquelette, la stimulation rapide de RhoA et Rac1, et explique la modulation du spliceosome du VEGF au profit du VEGFm. Pour la signalisation du VEGF, l'expression soutenue de Flt1 semble déterminante car elle peut activer des voies non canoniques de Wnt, expliquant à long-terme l'activation de RhoA et de Rac1 donc l'action inactivatrice de l'adipogénèse et la stimulation de l'ostéogénèse.

Concernant notre modèle d'études, les fibroblastes embryonnaires C3H10T1/2, nous pouvons émettre les critiques suivantes, ce modèle n'est jamais utilisé par les équipes qui travaillent sur les régulations de facteurs adipogéniques (adiponectine/leptine) car leurs expressions sont faibles comparées au pré-adipocyte 3T3L1 par exemple. De plus, les équipes travaillant sur des phases tardives de l'ostéoblastogénèse (minéralisation) ne choisissent pas non plus cette lignée car les cellules ne minéralisent pas en condition standard (acide ascorbique et β -glycérophosphate) pour les raisons déjà évoquées. Cependant avec des signaux adipogéniques standard (IBMX, insuline et dexaméthasone) ou avec des agonistes de PPAR γ 2, nos C3H10T1/2 révèlent des expressions faibles mais positives de marqueur adipeux blanc classique (adiponectine et leptine) mais aussi des expressions d'UCP1, PRDM16, CIDEA qui signent un typage plus brun. Ainsi les bonnes raisons pour lesquelles les biologistes des tissus adipeux blancs rejettent notre modèle pourraient nous fournir des arguments pour le proposer comme modèle d'adipocytes médullaires connus pour leur typage mixte. Des combinaisons entre nos milieux AD classiques et rosiglitazone pourraient permettre d'équilibrer les niveaux d'expressions pour mieux définir ce modèle médullaire.

Le Ranélate de Strontium a été approuvé en 2004 par l'Union Européenne comme traitement de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées et en 2012 celui-ci a été étendu aux hommes. Cependant, depuis 2011 les rapports bénéfices/risques montrent des augmentations des troubles cardiaques, incluant les infarctus myocardiques, chez les patients traités au Ranélate de Strontium (*Periodic Safety Update Report (PSUR)*), comparés à un placebo (1,7% contre 1,1% avec un risque relatif de 1,6). En réponse à ces mesures, le Comité pour l'Evaluation des Risques en matière de Pharmacovigilance (PRAC) et le Comité des médicaments à usage humain (CHMP) décide en avril 2013

de limiter l'utilisation du Ranélate de Strontium au « traitement des ostéoporoses sévères des femmes ménopausées à haut risque de fractures et aux hommes dont le risque de fractures est en augmentation ». De plus, de nouvelles contre-indications ont été ajoutées pour les patients ayant des risques de maladies cardiaques, des artères, de vascularisation cérébrale, de diabète ou d'hypertension.

La majorité des effets indésirables à l'utilisation du strontium, étant cardiovasculaires (accidents thromboemboliques veineux), ceux-ci semblent à présent évidents, compte tenu de la forte modulation du VEGF, de ses isoformes et de ses récepteurs, effectué par le strontium lors de nos cultures *in vitro*. Si ceux-ci ne semblaient pas altérer nos cultures, ces mêmes effets rapportés à l'ensemble du corps peuvent avoir des conséquences beaucoup plus dévastatrices sur les réseaux vasculaires, ce qui peut expliquer la survenue d'accidents thromboemboliques veineux.

Cependant, le strontium peut être utilisé en tant qu'ostéoinducteur de l'ostéogénèse, comme indiqué précédemment, ou substitué dans des matériaux à base de calcium. Cette induction de l'ostéogénèse associée à l'angiogénèse par le VEGF font déjà de ces biomatériaux de bons substituts osseux pouvant être plus facilement vascularisés et donc limitant les problèmes de nécrose rencontrés fréquemment dans ces types de matériaux, tout en renforçant la formation d'un nouvel os (Roy et al. 2013; Masala et al. 2014; Sekine, Sakama, et Hamada 2013).



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Adjeitey, Mailloux, Dekemp, et Harper. 2013. « Mitochondrial Uncoupling in Skeletal Muscle by UCP1 Augments Energy Expenditure and Glutathione Content While Mitigating ROS Production ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 305 (3): E405-415. doi:10.1152/ajpendo.00057.2013.
- Aguiari, Leo, Zavan, Vindigni, Rimessi, Bianchi, Franzin, et al. 2008. « High Glucose Induces Adipogenic Differentiation of Muscle-Derived Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (4): 1226-1231. doi:10.1073/pnas.0711402105.
- Akter, Rivas, Geneau, Drissi, et Duque. 2009. « Effect of Lamin A/C Knockdown on Osteoblast Differentiation and Function ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 24 (2): 283-293. doi:10.1359/jbmr.081010.
- Akune, Ohba, Kamekura, Yamaguchi, Chung, Kubota, Terauchi, et al. 2004. « PPARgamma Insufficiency Enhances Osteogenesis through Osteoblast Formation from Bone Marrow Progenitors ». *The Journal of Clinical Investigation* 113 (6): 846-855. doi:10.1172/JCI19900.
- Al-Sanabani, Madfa, et Al-Sanabani. 2013. « Application of Calcium Phosphate Materials in Dentistry ». *International Journal of Biomaterials* 2013: 876132. doi:10.1155/2013/876132.
- Alenghat, et Ingber. 2002. « Mechanotransduction: All Signals Point to Cytoskeleton, Matrix, and Integrins ». *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2002 (119): pe6. doi:10.1126/stke.2002.119.pe6.
- Almeida, Ambrogini, Han, Manolagas, et Jilka. 2009. « Increased Lipid Oxidation Causes Oxidative Stress, Increased Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Expression, and Diminished pro-Osteogenic Wnt Signaling in the Skeleton ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (40): 27438-27448. doi:10.1074/jbc.M109.023572.
- Anderson, Shergill, Barry, Manousiouthakis, Chen, Botvinick, Platt, Iruela-Arispe, et Segura. 2011. « VEGF Internalization Is Not Required for VEGFR-2 Phosphorylation in Bioengineered Surfaces with Covalently Linked VEGF ». *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 3 (9): 887-896. doi:10.1039/c1ib00037c.
- Angele, Yoo, Smith, Mansour, Jepsen, Nerlich, et Johnstone. 2003. « Cyclic Hydrostatic Pressure Enhances the Chondrogenic Phenotype of Human Mesenchymal Progenitor Cells Differentiated *in vitro* ». *Journal of Orthopaedic Research* 21 (3): 451-457. doi:10.1016/S0736-0266(02)00230-9.
- Antonenkova, Grunau, Ohlmeier, et Hiltunen. 2010. « Peroxisomes Are Oxidative Organelles ». *Antioxidants & Redox Signaling* 13 (4): 525-537. doi:10.1089/ars.2009.2996.
- Armulik, Genové, et Betsholtz. 2011. « Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises ». *Developmental Cell* 21 (2): 193-215. doi:10.1016/j.devcel.2011.07.001.
- Arnsdorf, Tummala, et Jacobs. 2009. « Non-Canonical Wnt Signaling and N-Cadherin Related Beta-Catenin Signaling Play a Role in Mechanically Induced Osteogenic Cell Fate ». *PloS One* 4 (4): e5388. doi:10.1371/journal.pone.0005388.
- Arnsdorf, Tummala, Kwon, et Jacobs. 2009. « Mechanically Induced Osteogenic Differentiation--the Role of RhoA, ROCKII and Cytoskeletal Dynamics ». *Journal of Cell Science* 122 (Pt 4): 546-553. doi:10.1242/jcs.036293.
- Asano, Morimatsu, Nikami, Yoshida, et Saito. 1997. « Adrenergic Activation of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Expression in Rat Brown Adipose Tissue: Implication in Cold-Induced Angiogenesis ». *The Biochemical Journal* 328 (Pt 1) (novembre): 179-183.
- Atkins, Welldon, Halbout, et Findlay. 2009. « Strontium Ranelate Treatment of Human Primary Osteoblasts Promotes an Osteocyte-like Phenotype While Eliciting an Osteoprotegerin Response ». *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 20 (4): 653-664. doi:10.1007/s00198-008-0728-6.
- Aveline, Toumi, Lespessailles, Boudot, Mentaverri, Rochefort, et Benhamou. 2013. « Calcium Sensing Receptor is expressed on/in osteocyte-like MLOY4 culture and modulated by strontium ranelate ». *Bone Abstracts*, mai. doi:10.1530/boneabs.1.PP238.
- Avery. 2011. « Molecular Targets of Oxidative Stress ». *The Biochemical Journal* 434 (2): 201-210. doi:10.1042/BJ20101695.
- Bacic, Edwards, et Merrill. 1995. « Differential Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (vascular Permeability Factor) Forms in Rat Tissues ». *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 12 (1): 11-15. doi:10.3109/08977199509003209.
- Bagchi, Kim, Boucher, Walshe, Kahn, et D'Amore. 2013. « Vascular Endothelial Growth Factor Is Important for Brown Adipose Tissue Development and Maintenance ». *The FASEB Journal* 27 (8): 3257-3271. doi:10.1096/fj.12-221812.

Références bibliographiques

- Bai, Huang, Jia, Fan, et Wang. 2010. « Endothelium Oriented Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells under Chemical and Mechanical Stimulations ». *Journal of Biomechanics* 43 (6): 1176-1181. doi:10.1016/j.jbiomech.2009.11.030.
- Bakker, Zandieh-Doulabi, et Klein-Nulend. 2013. « Strontium Ranelate affects signaling from mechanically-stimulated osteocytes towards osteoclasts and osteoblasts ». *Bone* 53 (1): 112-119. doi:10.1016/j.bone.2012.11.044.
- Balaban, Nemoto, et Finkel. 2005. « Mitochondria, Oxidants, and Aging ». *Cell* 120 (4): 483-495. doi:10.1016/j.cell.2005.02.001.
- Bärenholdt, Kolthoff, et Nielsen. 2009. « Effect of Long-Term Treatment with Strontium Ranelate on Bone Strontium Content ». *Bone* 45 (2): 200-206. doi:10.1016/j.bone.2009.04.196.
- Baron, et Kneissel. 2013. « WNT Signaling in Bone Homeostasis and Disease: From Human Mutations to Treatments ». *Nature Medicine* 19 (2): 179-192. doi:10.1038/nm.3074.
- Bartelt, et Heeren. 2014. « Adipose Tissue Browning and Metabolic Health ». *Nature Reviews. Endocrinology* 10 (1): 24-36. doi:10.1038/nrendo.2013.204.
- Bedard, et Krause. 2007. « The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology ». *Physiological Reviews* 87 (1): 245-313. doi:10.1152/physrev.00044.2005.
- Beier, Maher, Sheu, Cory-Slechta, Berger, Zuscik, et Puzas. 2013. « Heavy Metal Lead Exposure, Osteoporotic-like Phenotype in an Animal Model, and Depression of Wnt Signaling ». *Environmental Health Perspectives* 121 (1): 97-104. doi:10.1289/ehp.1205374.
- Belaid, Cerezo, Chargui, Corcelle-Termeau, Pedetour, Giuliano, Ilie, et al. 2013. « Autophagy Plays a Critical Role in the Degradation of Active RHOA, the Control of Cell Cytokinesis, and Genomic Stability ». *Cancer Research* 73 (14): 4311-4322. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4142.
- Berendsen, et Olsen. 2013. « How Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF) Regulates Differentiation of Mesenchymal Stem Cells ». *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, décembre, 0022155413516347. doi:10.1369/0022155413516347.
- Berendsen, et Olsen. 2014. « Osteoblast–adipocyte Lineage Plasticity in Tissue Development, Maintenance and Pathology ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (3): 493-497. doi:10.1007/s00018-013-1440-z.
- Beysens, Carotenuto, Loon, et Zell. 2011. *Laboratory Science with Space Data: Accessing and Using Space-Experiment Data*. Springer.
- Bianco, Cao, Frenette, Mao, Robey, Simmons, et Wang. 2013. « The Meaning, the Sense and the Significance: Translating the Science of Mesenchymal Stem Cells into Medicine ». *Nature Medicine* 19 (1): 35-42. doi:10.1038/nm.3028.
- Blake, et Fogelman. 2005. « Long-Term Effect of Strontium Ranelate Treatment on BMD ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20 (11): 1901-1904. doi:10.1359/JBMR.050810.
- Boer, van Nieuw Amerongen, Groeneveld, Scheffer, de Lange, Westerhof, van Hinsbergh, et Sipkema. 2004. « Smooth Muscle F-Actin Disassembly and RhoA/Rho-Kinase Signaling during Endotoxin-Induced Alterations in Pulmonary Arterial Compliance ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 287 (4): L649-655. doi:10.1152/ajplung.00219.2003.
- Boeuf, Houle, Sussman, et Huot. 2006. « Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase (FAK) on Ser732 Is Induced by Rho-Dependent Kinase and Is Essential for Proline-Rich Tyrosine Kinase-2–mediated Phosphorylation of FAK on Tyr407 in Response to Vascular Endothelial Growth Factor ». *Molecular Biology of the Cell* 17 (8): 3508-3520. doi:10.1091/mbc.E05-12-1158.
- Bolland, Avenell, Baron, Grey, MacLennan, Gamble, et Reid. 2010. « Effect of Calcium Supplements on Risk of Myocardial Infarction and Cardiovascular Events: Meta-Analysis ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 341: c3691.
- Bonnelye, Chabadel, Saltel, et Jurdic. 2008. « Dual Effect of Strontium Ranelate: Stimulation of Osteoblast Differentiation and Inhibition of Osteoclast Formation and Resorption *in vitro* ». *Bone* 42 (1): 129-138. doi:10.1016/j.bone.2007.08.043.
- Bonnevier, Malmqvist, Sonntag, Schroeter, Nilsson, Pfitzer, et Arner. 2002. « Sustained Norepinephrine Contraction in the Rat Portal Vein Is Lost When Ca(2+) Is Replaced with Sr(2+) ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 282 (4): C845-852. doi:10.1152/ajpcell.00191.2001.
- Bose, Fielding, Tarafder, et Bandyopadhyay. 2013. « Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics ». *Trends in Biotechnology*, septembre. doi:10.1016/j.tibtech.2013.06.005.
- Boskey, et Robey. 2013. « The composition of bone. » In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, Wiley. Hoboken.

Références bibliographiques

- Brown, et MacLeod. 2001. « Extracellular Calcium Sensing and Extracellular Calcium Signaling ». *Physiological Reviews* 81 (1): 239-297.
- Bryan, Dennstedt, Mitchell, Walshe, Noma, Loureiro, Saint-Geniez, Campaigniac, Liao, et D'Amore. 2010. « RhoA/ROCK Signaling Is Essential for Multiple Aspects of VEGF-Mediated Angiogenesis ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (9): 3186-3195. doi:10.1096/fj.09-145102.
- Buckwalter, et Cooper. 1987. « Bone Structure and Function ». *Instructional Course Lectures* 36: 27-48.
- Buravkova. 2010. « Problems of the Gravitational Physiology of a Cell ». *Human Physiology* 36 (7): 746-753. doi:10.1134/S0362119710070030.
- Burger, et Klein-Nulend. 1998. « Microgravity and Bone Cell Mechanosensitivity ». *Bone* 22 (5 Suppl): 127S-130S.
- Cai, Griendling, et Harrison. 2003. « The Vascular NAD(P)H Oxidases as Therapeutic Targets in Cardiovascular Diseases ». *Trends in Pharmacological Sciences* 24 (9): 471-478. doi:10.1016/S0165-6147(03)00233-5.
- Canalis. 2005. « Mechanisms of Glucocorticoid Action in Bone ». *Current Osteoporosis Reports* 3 (3): 98-102.
- Cao. 2007. « Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity ». *Journal of Clinical Investigation* 117 (9): 2362-2368. doi:10.1172/JCI32239.
- Carmeliet, G, Vico, et Bouillon. 2001. « Space Flight: A Challenge for Normal Bone Homeostasis ». *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 11 (1-3): 131-144.
- Carmeliet, P., Ferreira, Breier, Pollefeyt, Kieckens, Gertsenstein, Fahrig, et al. 1996. « Abnormal Blood Vessel Development and Lethality in Embryos Lacking a Single VEGF Allele ». *Nature* 380 (6573): 435-439. doi:10.1038/380435a0.
- Casteilla, et Dani. 2006. « Adipose Tissue-Derived Cells: From Physiology to Regenerative Medicine ». *Diabetes & Metabolism* 32 (5 Pt 1): 393-401.
- Caudrillier, Hurtel-Lemaire, Wattel, Cournarie, Godin, Petit, Petit, et al. 2010. « Strontium Ranelate Decreases Receptor Activator of Nuclear Factor-KB Ligand-Induced Osteoclastic Differentiation *in vitro*: Involvement of the Calcium-Sensing Receptor ». *Molecular Pharmacology* 78 (4): 569-576. doi:10.1124/mol.109.063347.
- Caverzasio. 2008. « Strontium Ranelate Promotes Osteoblastic Cell Replication through at Least Two Different Mechanisms ». *Bone* 42 (6): 1131-1136. doi:10.1016/j.bone.2008.02.010.
- Center, Nguyen, Schneider, Sambrook, et Eisman. 1999. « Mortality after All Major Types of Osteoporotic Fracture in Men and Women: An Observational Study ». *Lancet* 353 (9156): 878-882. doi:10.1016/S0140-6736(98)09075-8.
- Chang, W, Tu, Chen, Komuves, Oda, Pratt, Miller, et Shoback. 1999. « Expression and Signal Transduction of Calcium-Sensing Receptors in Cartilage and Bone ». *Endocrinology* 140 (12): 5883-5893. doi:10.1210/endo.140.12.7190.
- Chang, Wenhan, et Shoback. 2004. « Extracellular Ca²⁺-Sensing Receptors--an Overview ». *Cell Calcium* 35 (3): 183-196.
- Chen, Chien-Tsun, Shih, Kuo, Lee, et Wei. 2008. « Coordinated Changes of Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Enzymes during Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (4): 960-968. doi:10.1634/stemcells.2007-0509.
- Chen, Jun, Liu, Yang, Li, Zhang, Li, Wang, et Ma. 2011. « The Simulated Microgravity Enhances the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Neurons ». *Neuroscience Letters* 505 (2): 171-175. doi:10.1016/j.neulet.2011.10.014.
- Chen, Qing, Shou, Zhang, Xu, Zheng, Han, Li, et al. 2014. « An Osteopontin-Integrin Interaction Plays a Critical Role in Directing Adipogenesis and Osteogenesis by Mesenchymal Stem Cells ». *STEM CELLS* 32 (2): 327-37. doi:10.1002/stem.1567.
- Chen, Tom T., Luque, Lee, Anderson, Segura, et Iruela-Arispe. 2010. « Anchorage of VEGF to the Extracellular Matrix Conveys Differential Signaling Responses to Endothelial Cells ». *The Journal of Cell Biology* 188 (4): 595-609. doi:10.1083/jcb.200906044.
- Chi, Waypa, Mungai, et Schumacker. 2010. « Prolonged Hypoxia Increases ROS Signaling and RhoA Activation in Pulmonary Artery Smooth Muscle and Endothelial Cells ». *Antioxidants & Redox Signaling* 12 (5): 603-610. doi:10.1089/ars.2009.2861.
- Chiariello, Vaqué, Crespo, et Gutkind. 2010. « Activation of Ras and Rho GTPases and MAP Kinases by G-Protein-Coupled Receptors ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 661: 137-150. doi:10.1007/978-1-60761-795-2_8.
- Chiarugi, Pani, Giannoni, Taddei, Colavitti, Raugei, Symons, Borrello, Galeotti, et Ramponi. 2003. « Reactive Oxygen Species as Essential Mediators of Cell Adhesion: The Oxidative Inhibition of a FAK Tyrosine

- Phosphatase Is Required for Cell Adhesion ». *The Journal of Cell Biology* 161 (5): 933-944. doi:10.1083/jcb.200211118.
- Cho, Kim, Ki, Hwang, Choi, Lee, et Kim. 2007. « Role of Gα12 and Gα13 as Novel Switches for the Activity of Nrf2, a Key Antioxidative Transcription Factor ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (17): 6195-6208. doi:10.1128/MCB.02065-06.
- Choudhary, Halbout, Alander, Raisz, et Pilbeam. 2007. « Strontium Ranelate Promotes Osteoblastic Differentiation and Mineralization of Murine Bone Marrow Stromal Cells: Involvement of Prostaglandins ». *Journal of Bone and Mineral Research* 22 (7): 1002-10. doi:10.1359/jbmr.070321.
- Chowdhury, Na, Li, Poh, Tanaka, Wang, et Wang. 2010. « Material Properties of the Cell Dictate Stress-Induced Spreading and Differentiation in Embryonic Stem Cells ». *Nature Materials* 9 (1): 82-88. doi:10.1038/nmat2563.
- Cioffi, Shafer, Zupancic, Smith-Gbur, Mikhail, Platika, et Snodgrass. 1996. « Novel B219/OB Receptor Isoforms: Possible Role of Leptin in Hematopoiesis and Reproduction ». *Nature Medicine* 2 (5): 585-589.
- Clarke. 2008. « Normal Bone Anatomy and Physiology ». *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 3 Suppl 3 (novembre): S131-139. doi:10.2215/CJN.04151206.
- Clément. 2011. *Fundamentals of Space Medicine*. Springer.
- Cogoli. 2006. « In Fundamentals of Space Biology: Research on Cells, Animals, and Plants in Space ». In *Cell Biology*, Springer, 121-70. New York: Clement G. and Slenzka K.
- Coleman, Grisham, et Smith. 1994. « Morphologic Transformation of the C3H 10T1/2 Cell Line Is Accompanied by Altered Expression of the p53 Tumor Suppressor Gene ». *Carcinogenesis* 15 (2): 145-152.
- Cornali, Zietz, Benelli, Weninger, Masiello, Breier, Tschachler, Albini, et Stürzl. 1996. « Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Angiogenesis and Vascular Permeability in Kaposi's Sarcoma ». *The American Journal of Pathology* 149 (6): 1851-1869.
- Coulombe, Faure, Robin, et Ruat. 2004. « In vitro Effects of Strontium Ranelate on the Extracellular Calcium-Sensing Receptor ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323 (4): 1184-1190. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.209.
- Cranney, Tugwell, Adachi, Weaver, Zytaruk, Papaioannou, Robinson, et al. 2002. « Meta-Analyses of Therapies for Postmenopausal Osteoporosis. III. Meta-Analysis of Risedronate for the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis ». *Endocrine Reviews* 23 (4): 517-523. doi:10.1210/er.2001-3002.
- Cranney, Wells, Willan, Griffith, Zytaruk, Robinson, Black, et al. 2002. « Meta-Analyses of Therapies for Postmenopausal Osteoporosis. II. Meta-Analysis of Alendronate for the Treatment of Postmenopausal Women ». *Endocrine Reviews* 23 (4): 508-516. doi:10.1210/er.2001-2002.
- Crisan, Yap, Casteilla, Chen, Corselli, Park, Andriolo, et al. 2008. « A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs ». *Cell Stem Cell* 3 (3): 301-313. doi:10.1016/j.stem.2008.07.003.
- Cristancho, et Lazar. 2011. « Forming Functional Fat: A Growing Understanding of Adipocyte Differentiation ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (11): 722-734. doi:10.1038/nrm3198.
- Criswell-Hudak. 1991. « Immune Response during Space Flight ». *Experimental Gerontology* 26 (2-3): 289-296.
- Croissandeau, Chrétien, et Mbikay. 2002. « Involvement of Matrix Metalloproteinases in the Adipose Conversion of 3T3-L1 Preadipocytes ». *The Biochemical Journal* 364 (Pt 3): 739-746. doi:10.1042/BJ20011158.
- Dahl, Allain, Marie, Mauras, Boivin, Ammann, Tsouderos, Delmas, et Christiansen. 2001. « Incorporation and distribution of strontium in bone ». *Bone* 28 (4): 446-453. doi:10.1016/S8756-3282(01)00419-7.
- Dai, Wang, Ling, Wan, et Li. 2007. « Simulated Microgravity Inhibits the Proliferation and Osteogenesis of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells ». *Cell Proliferation* 40 (5): 671-684. doi:10.1111/j.1365-2184.2007.00461.x.
- Dalby, Di Silvio, Harper, et Bonfield. 2002. « Increasing Hydroxyapatite Incorporation into Poly(methylmethacrylate) Cement Increases Osteoblast Adhesion and Response ». *Biomaterials* 23 (2): 569-576.
- Danen, Sonneveld, Brakebusch, Fassler, et Sonnenberg. 2002. « The Fibronectin-Binding Integrins α5β1 and αvβ3 Differentially Modulate RhoA-GTP Loading, Organization of Cell Matrix Adhesions, and Fibronectin Fibrillogenesis ». *The Journal of Cell Biology* 159 (6): 1071-1086. doi:10.1083/jcb.200205014.
- Daugaard, Nitsch, Razaghi, McDonald, Jarrar, Torrino, Castillo-Lluya, et al. 2013. « Haxe1 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes ». *Nature Communications* 4 (juillet). doi:10.1038/ncomms3180.
- David, Martin, Lafage-Proust, Malaval, Peyroche, Jones, Vico, et Guignandon. 2007. « Mechanical Loading Down-Regulates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Bone Marrow Stromal Cells and Favors

Références bibliographiques

- Osteoblastogenesis at the Expense of Adipogenesis ». *Endocrinology* 148 (5): 2553-2562. doi:10.1210/en.2006-1704.
- Davis, Bayless, Davis, et Meininger. 2000. « Regulation of Tissue Injury Responses by the Exposure of Matricryptic Sites within Extracellular Matrix Molecules ». *The American Journal of Pathology* 156 (5): 1489-1498. doi:10.1016/S0002-9440(10)65020-1.
- De Groot, Rijken, Boonstra, Verkleij, de Laat, et Kruijer. 1991. « Epidermal Growth Factor-Induced Expression of c-Fos Is Influenced by Altered Gravity Conditions ». *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 62 (1): 37-40.
- Deckers, Karperien, Bent, Yamashita, Papapoulos, et Löwik. 2013. « Expression of Vascular Endothelial Growth Factors and Their Receptors during Osteoblast Differentiation ». Research-article. http://press.endocrine.org.gate2.inist.fr/doi/abs/10.1210/endo.141.5.7458?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed.
- Deckers, van Bezooijen, van der Horst, Hoogendam, van Der Bent, Papapoulos, et Löwik. 2002. « Bone Morphogenetic Proteins Stimulate Angiogenesis through Osteoblast-Derived Vascular Endothelial Growth Factor A ». *Endocrinology* 143 (4): 1545-1553. doi:10.1210/endo.143.4.8719.
- Dela Paz, Melchior, et Frangos. 2013. « Early VEGFR2 Activation in Response to Flow Is VEGF-Dependent and Mediated by MMP Activity ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434 (3): 641-646. doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.134.
- Dela Paz, Walshe, Leach, Saint-Geniez, et D'Amore. 2012. « Role of Shear-Stress-Induced VEGF Expression in Endothelial Cell Survival ». *Journal of Cell Science* 125 (Pt 4): 831-843. doi:10.1242/jcs.084301.
- Delvoye, Wiliquet, Levêque, Nusgens, et Lapière. 1991. « Measurement of Mechanical Forces Generated by Skin Fibroblasts Embedded in a Three-Dimensional Collagen Gel ». *The Journal of Investigative Dermatology* 97 (5): 898-902.
- Devlin, Cloutier, Thomas, Panus, Lotinun, Pinz, Baron, Rosen, et Bouxsein. 2010. « Caloric Restriction Leads to High Marrow Adiposity and Low Bone Mass in Growing Mice ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25 (9): 2078-2088. doi:10.1002/jbmr.82.
- Di Lullo, Sweeney, Korkko, Ala-Kokko, et San Antonio. 2002. « Mapping the Ligand-Binding Sites and Disease-Associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (6): 4223-4231. doi:10.1074/jbc.M110709200.
- Di-Poï, Fauré, Grizot, Molnár, Pick, et Dagher. 2001. « Mechanism of NADPH Oxidase Activation by the Rac/Rho-GDI Complex ». *Biochemistry* 40 (34): 10014-10022.
- Dibbens, Miller, Damert, Risau, Vadas, et Goodall. 1999. « Hypoxic Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Stability Requires the Cooperation of Multiple RNA Elements ». *Molecular Biology of the Cell* 10 (4): 907-919.
- Dröge. 2002. « Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function ». *Physiological Reviews* 82 (1): 47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.
- Ducluzeau, Priou, Weithimer, Flammet, Duluc, Iacobazi, Soleti, et al. 2011. « Dynamic Regulation of Mitochondrial Network and Oxidative Functions during 3T3-L1 Fat Cell Differentiation ». *Journal of Physiology and Biochemistry* 67 (3): 285-296. doi:10.1007/s13105-011-0074-6.
- Ducy. 2000. « Cbfa1: A Molecular Switch in Osteoblast Biology ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 219 (4): 461-471. doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1074>3.0.CO;2-C.
- Dumas, Perrier, Malaval, Laroche, Guignandon, Vico, et Rattner. 2009. « The Effect of Dual Frequency Cyclic Compression on Matrix Deposition by Osteoblast-like Cells Grown in 3D Scaffolds and on Modulation of VEGF Variant Expression ». *Biomaterials* 30 (19): 3279-3288. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.048.
- Dupont, Morsut, Aragona, Enzo, Giulitti, Cordenonsi, Zanconato, et al. 2011. « Role of YAP/TAZ in Mechanotransduction ». *Nature* 474 (7350): 179-183. doi:10.1038/nature10137.
- Dvorak, et Riccardi. 2004. « Ca²⁺ as an Extracellular Signal in Bone ». *Cell Calcium* 35 (3): 249-255.
- Eckardt, Ding, Lind, Hansen, Christensen, et Hvid. 2005. « Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor Enhances Bone Healing in an Experimental Nonunion Model ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 87 (10): 1434-1438. doi:10.1302/0301-620X.87B10.16226.
- Elbaz, Rivas, et Duque. 2009. « Effect of Estrogens on Bone Marrow Adipogenesis and Sirt1 in Aging C57BL/6J Mice ». *Biogerontology* 10 (6): 747-755. doi:10.1007/s10522-009-9221-7.
- El-Remessy AB, Tawfik HE, Matragoon S, Pillai B, Caldwell RB, Caldwell RW. Peroxynitrite mediates diabetes-induced endothelial dysfunction: possible role of Rho kinase activation. *Exp Diabetes Res* 2010; 2010:247861; PMID:21052489; <http://dx.doi.org/10.1155/2010/247861>

Références bibliographiques

- Engler, Sen, Sweeney, et Discher. 2006. « Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification ». *Cell* 126 (4): 677-689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044.
- Essers, de Vries-Smits, Barker, Polderman, Burgering, et Korswagen. 2005. « Functional Interaction between Beta-Catenin and FOXO in Oxidative Stress Signaling ». *Science (New York, N.Y.)* 308 (5725): 1181-1184. doi:10.1126/science.1109083.
- Etienne-Manneville, et Hall. 2002. « Rho GTPases in Cell Biology ». *Nature* 420 (6916): 629-635. doi:10.1038/nature01148.
- Faure, Linossier, Malaval, Lafage-Proust, Peyroche, Vico, et Guignandon. 2008. « Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerisation ». *Bone* 42 (6): 1092-1101. doi:10.1016/j.bone.2008.02.011.
- Faure, Vico, Tracqui, Laroche, Vanden-Bossche, Linossier, Rattner, et Guignandon. 2010. « Functionalization of matrices by cyclically stretched osteoblasts through matrix targeting of VEGF ». *Biomaterials* 31 (25): 6477-6484. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.011.
- Féral, Zijlstra, Tkachenko, Prager, Gardel, Slepak, et Ginsberg. 2007. « CD98hc (SLC3A2) Participates in Fibronectin Matrix Assembly by Mediating Integrin Signaling ». *The Journal of Cell Biology* 178 (4): 701-711. doi:10.1083/jcb.200705090.
- Fernández, Molinuevo, McCarthy, et Cortizo. 2014. « Strontium Ranelate Stimulates the Activity of Bone-Specific Alkaline Phosphatase: Interaction with Zn²⁺ and Mg²⁺ ». *BioMetals* 27 (3): 601-607. doi:10.1007/s10534-014-9733-8.
- Fernández, Molinuevo, Sedlinsky, Schurman, Cortizo, et McCarthy. 2013. « Strontium ranelate prevents the deleterious action of advanced glycation endproducts on osteoblastic cells via calcium channel activation ». *European Journal of Pharmacology* 706 (1-3): 41-47. doi:10.1016/j.ejphar.2013.02.042.
- Fève, Moldes, El Hadri, Lasnier, et Pairault. 1998. « La différenciation adipocytaire : tout un programme... » *médecine/sciences* 14 (8-9): 848. doi:10.4267/10608/1156.
- Fitts, Riley, et Widrick. 2001. « Functional and Structural Adaptations of Skeletal Muscle to Microgravity ». *The Journal of Experimental Biology* 204 (Pt 18): 3201-3208.
- Fleming, Elliott, et Exton. 1996. « Differential Translocation of Rho Family GTPases by Lysophosphatidic Acid, Endothelin-1, and Platelet-Derived Growth Factor ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (51): 33067-33073.
- Fournier, Perrier, Thomas, Laroche, Dumas, Rattner, Vico, et Guignandon. 2012. « Reduction by Strontium of the Bone Marrow Adiposity in Mice and Repression of the Adipogenic Commitment of Multipotent C3H10T1/2 Cells ». *Bone* 50 (2): 499-509. doi:10.1016/j.bone.2011.07.038.
- Fritsch-Yelle, Charles, Jones, et Wood. 1996. « Microgravity Decreases Heart Rate and Arterial Pressure in Humans ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 80 (3): 910-914.
- Fromigué, Haÿ, Barbara, et Marie. 2010. « Essential Role of Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT)-Mediated Wnt Signaling in Osteoblast Differentiation Induced by Strontium Ranelate ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (33): 25251-25258. doi:10.1074/jbc.M110.110502.
- Fromigué, Haÿ, Barbara, Petrel, Traiffort, Ruat, et Marie. 2009. « Calcium Sensing Receptor-Dependent and Receptor-Independent Activation of Osteoblast Replication and Survival by Strontium Ranelate ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (8B): 2189-2199. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00673.x.
- Fujieda, Mogami, Moriyasu, et Mori. 1999. « Nonequilibrium / Nonlinear Chemical Oscillation in the Virtual Absence of Gravity ». *Advances in Space Research: The Official Journal of the Committee on Space Research (COSPAR)* 23 (12): 2057-2063.
- Fujisawa, Nishikawa, Kukidome, Imoto, Yamashiro, Motoshima, Matsumura, et Araki. 2009. « TZDs Reduce Mitochondrial ROS Production and Enhance Mitochondrial Biogenesis ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379 (1): 43-48. doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.141.
- Gao, McBeath, et Chen. 2010. « Stem Cell Shape Regulates a Chondrogenic Versus Myogenic Fate Through Rac1 and N-Cadherin ». *STEM CELLS*, N/A-N/A. doi:10.1002/stem.308.
- Gardiner, Pestonjasp, Bohl, Chamberlain, Hahn, et Bokoch. 2002. « Spatial and Temporal Analysis of Rac Activation during Live Neutrophil Chemotaxis ». *Current Biology: CB* 12 (23): 2029-2034.
- Gerber, Malik, Solar, Sherman, Liang, Meng, Hong, Marsters, et Ferrara. 2002. « VEGF Regulates Haematopoietic Stem Cell Survival by an Internal Autocrine Loop Mechanism ». *Nature* 417 (6892): 954-958. doi:10.1038/nature00821.
- Gille, Kowalski, Li, LeCouter, Moffat, Zioncheck, Pelletier, et Ferrara. 2001. « Analysis of Biological Effects and Signaling Properties of Flt-1 (VEGFR-1) and FLK-1 (VEGFR-2). A Reassessment Using Novel Receptor-Specific Vascular Endothelial Growth Factor Mutants ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (5): 3222-3230. doi:10.1074/jbc.M002016200.

Références bibliographiques

- Gimble, J M. 1990. « The Function of Adipocytes in the Bone Marrow Stroma ». *The New Biologist* 2 (4): 304-312.
- Gimble, Jeffrey M., et Nuttall. 2004. « Bone and Fat ». *Endocrine* 23 (2-3): 183-188. doi:10.1385/ENDO:23:2-3:183.
- Giordano, Smorlesi, Frontini, Barbatelli, et Cinti. 2014. « MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: White, Brown and Pink Adipocytes: The Extraordinary Plasticity of the Adipose Organ ». *European Journal of Endocrinology* 170 (5): R159-R171. doi:10.1530/EJE-13-0945.
- Giorgi, Agnoletto, Baldini, Bononi, Bonora, Marchi, Missiroli, et al. 2010. « Redox Control of Protein Kinase C: Cell- and Disease-Specific Aspects ». *Antioxidants & Redox Signaling* 13 (7): 1051-1085. doi:10.1089/ars.2009.2825.
- Golub, et Boesze-Battaglia. 2007. « The role of alkaline phosphatase in mineralization. [Miscellaneous Article] ». *Current Opinion in Orthopaedics September 2007* 18 (5): 444-448. doi:10.1097/BCO.0b013e3282630851.
- González-Vázquez, Planell, et Engel. 2014. « Extracellular Calcium and CaSR Drive Osteoinduction in Mesenchymal Stromal Cells ». *Acta Biomaterialia* 10 (6): 2824-2833. doi:10.1016/j.actbio.2014.02.004.
- Gourion-Arsiquaud, Lukashova, Power, Loveridge, Reeve, et Boskey. 2013. « Fourier Transform Infrared Imaging of Femoral Neck Bone: Reduced Heterogeneity of Mineral-to-Matrix and Carbonate-to-Phosphate and More Variable Crystallinity in Treatment-Naive Fracture Cases Compared with Fracture-Free Controls ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 28 (1): 150-161. doi:10.1002/jbmr.1724.
- Gozin, Franzini, Andrieu, Da Costa, Rollet-Labelle, et Pasquier. 1998. « Reactive Oxygen Species Activate Focal Adhesion Kinase, Paxillin and p130cas Tyrosine Phosphorylation in Endothelial Cells ». *Free Radical Biology & Medicine* 25 (9): 1021-1032.
- Grimm, Wise, Lebert, Richter, et Baatout. 2011. « How and Why Does the Proteome Respond to Microgravity? » *Expert Review of Proteomics* 8 (1): 13-27. doi:10.1586/epr.10.105.
- Gu, Xie, Huang, Peng, Tan, Li, et Yu. 2013. « Effects of Strontium-Doped Calcium Polyphosphate on Angiogenic Growth Factors Expression of Co-Culturing System *in vitro* and of Host Cell *in vivo* ». *RSC Advances* 4 (6): 2783-2792. doi:10.1039/C3RA44323J.
- Guignandon, A., Lafage-Proust, Usson, Laroche, Caillot-Augusseau, Alexandre, et Vico. 2001. « Cell Cycling Determines Integrin-Mediated Adhesion in Osteoblastic ROS 17/2.8 Cells Exposed to Space-Related Conditions ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (11): 2036-2038. doi:10.1096/fj.00-0837fje.
- Guignandon, Alain, Faure, Neutelings, Rattner, Mineur, Linossier, Laroche, et al. 2014. « Rac1 GTPase Silencing Counteracts Microgravity-Induced Effects on Osteoblastic Cells ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, juin. doi:10.1096/fj.14-249714.
- Guilluy, Swaminathan, Garcia-Mata, O'Brien, Superfine, et Burridge. 2011. « The Rho GEFs LARG and GEF-H1 Regulate the Mechanical Response to Force on Integrins ». *Nature Cell Biology* 13 (6): 722-727. doi:10.1038/ncb2254.
- Guo, et Zhao. 2013. « Integration of Mechanical and Chemical Signals by YAP and TAZ Transcription Coactivators ». *Cell & Bioscience* 3 (1): 33. doi:10.1186/2045-3701-3-33.
- Gutteridge. 1994. « Biological Origin of Free Radicals, and Mechanisms of Antioxidant Protection ». *Chemico-Biological Interactions* 91 (2-3): 133-140.
- Hagberg, Carolina E., Falkevall, Wang, Larsson, Huusko, Nilsson, van Meeteren, et al. 2010. « Vascular Endothelial Growth Factor B Controls Endothelial Fatty Acid Uptake ». *Nature* 464 (7290): 917-921. doi:10.1038/nature08945.
- Hagberg, Carolina, Mehlem, Falkevall, Muhl, et Eriksson. 2013. « Endothelial Fatty Acid Transport: Role of Vascular Endothelial Growth Factor B ». *Physiology* 28 (2): 125-134. doi:10.1152/physiol.00042.2012.
- Halder, Dupont, et Piccolo. 2012. « Transduction of Mechanical and Cytoskeletal Cues by YAP and TAZ ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 (9): 591-600. doi:10.1038/nrm3416.
- Hamidouché, Fromigué, Ringe, Häupl, Vaudin, Pagès, Srouji, Livne, et Marie. 2009. « Priming Integrin $\alpha 5$ Promotes Human Mesenchymal Stromal Cell Osteoblast Differentiation and Osteogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44): 18587-18591. doi:10.1073/pnas.0812334106.
- Hammond, et Hammond. 2001. « Optimized Suspension Culture: The Rotating-Wall Vessel ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 281 (1): F12-25.
- Hammond, Lewis, Goodwin, Linnehan, Wolf, Hire, Campbell, et al. 1999. « Gene Expression in Space ». *Nature Medicine* 5 (4): 359. doi:10.1038/7331.

- Harms, et Seale. 2013. « Brown and Beige Fat: Development, Function and Therapeutic Potential ». *Nature Medicine* 19 (10): 1252-1263. doi:10.1038/nm.3361.
- Harraz, Marden, Zhou, Zhang, Williams, Sharov, Nelson, et al. 2008. « SOD1 Mutations Disrupt Redox-Sensitive Rac Regulation of NADPH Oxidase in a Familial ALS Model ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (2): 659-670. doi:10.1172/JCI34060.
- Haudenschild, Anne K., Hsieh, Kapila, et Lotz. 2009. « Pressure and Distortion Regulate Human Mesenchymal Stem Cell Gene Expression ». *Annals of Biomedical Engineering* 37 (3): 492-502. doi:10.1007/s10439-008-9629-2.
- Haudenschild, Dominik R., Chen, Pang, Lotz, et D'Lima. 2010. « Rho Kinase-Dependent Activation of SOX9 in Chondrocytes ». *Arthritis and Rheumatism* 62 (1): 191-200. doi:10.1002/art.25051.
- Heo. 2010. « Redox Control of GTPases: From Molecular Mechanisms to Functional Significance in Health and Disease ». *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (4): 689-724. doi:10.1089/ars.2009.2984.
- Heo, et Campbell. 2005. « Mechanism of Redox-Mediated Guanine Nucleotide Exchange on Redox-Active Rho GTPases ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (35): 31003-31010. doi:10.1074/jbc.M504768200.
- Heo, Raines, Mocanu, et Campbell. 2006. « Redox Regulation of RhoA ». *Biochemistry* 45 (48): 14481-14489. doi:10.1021/bi0610101.
- Herrmann, Bär, Kreplak, Strelkov, et Aebi. 2007. « Intermediate Filaments: From Cell Architecture to Nanomechanics ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (7): 562-573. doi:10.1038/nrm2197.
- Hiltunen, Ruuskanen, Huuskonen, Mähönen, Ahonen, Rutanen, Kosma, Mahonen, Kröger, et Ylä-Herttuala. 2003. « Adenovirus-Mediated VEGF-A Gene Transfer Induces Bone Formation *in vivo* ». *The FASEB Journal*, avril. doi:10.1096/fj.02-0514fje.
- Hofbauer, Kühne, et Viereck. 2004. « The OPG/RANKL/RANK System in Metabolic Bone Diseases ». *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 4 (3): 268-275.
- Hogan, Chen, Nardone, et Rao. 2003. « Transcriptional Regulation by Calcium, Calcineurin, and NFAT ». *Genes & Development* 17 (18): 2205-2232. doi:10.1101/gad.1102703.
- Holmes, Roberts, Thomas, et Cross. 2007. « Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2: Structure, Function, Intracellular Signalling and Therapeutic Inhibition ». *Cellular Signalling* 19 (10): 2003-2012. doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.013.
- Hong, Hwang, McManus, Amsterdam, Tian, Kalmukova, Mueller, et al. 2005. « TAZ, a Transcriptional Modulator of Mesenchymal Stem Cell Differentiation ». *Science (New York, N.Y.)* 309 (5737): 1074-1078. doi:10.1126/science.1110955.
- Hordijk. 2006. « Regulation of NADPH Oxidases The Role of Rac Proteins ». *Circulation Research* 98 (4): 453-462. doi:10.1161/01.RES.0000204727.46710.5e.
- Houck, Leung, Rowland, Winer, et Ferrara. 1992. « Dual Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Bioavailability by Genetic and Proteolytic Mechanisms ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (36): 26031-26037.
- Houk, Jilkine, Mejean, Boltyanskiy, Dufresne, Angenent, Altschuler, Wu, et Weiner. 2012. « Membrane Tension Maintains Cell Polarity by Confining Signals to the Leading Edge during Neutrophil Migration ». *Cell* 148 (1-2): 175-188. doi:10.1016/j.cell.2011.10.050.
- Hovey, Goldhar, Baffi, et Vonderhaar. 2001. « Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Epithelial and Stromal Cells during Mouse Mammary Gland Development ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 15 (5): 819-831. doi:10.1210/mend.15.5.0635.
- Hu, Hilton, Tu, Yu, Ornitz, et Long. 2005. « Sequential Roles of Hedgehog and Wnt Signaling in Osteoblast Development ». *Development (Cambridge, England)* 132 (1): 49-60. doi:10.1242/dev.01564.
- Huang, C.-Y. Charles, Hagar, Frost, Sun, et Cheung. 2004. « Effects of Cyclic Compressive Loading on Chondrogenesis of Rabbit Bone-Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 22 (3): 313-323. doi:10.1634/stemcells.22-3-313.
- Huang, S, Chen, et Ingber. 1998. « Control of Cyclin D1, p27(Kip1), and Cell Cycle Progression in Human Capillary Endothelial Cells by Cell Shape and Cytoskeletal Tension ». *Molecular Biology of the Cell* 9 (11): 3179-3193.
- Huang, S, et Ingber. 1999. « The Structural and Mechanical Complexity of Cell-Growth Control ». *Nature Cell Biology* 1 (5): E131-138. doi:10.1038/13043.
- Huang, Yan, Zheng, Gong, Jia, Song, Liu, et Fan. 2012. « Effect of Cyclic Strain on Cardiomyogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells ». *PloS One* 7 (4): e34960. doi:10.1371/journal.pone.0034960.

Références bibliographiques

- Huang, Z, Cheng, et Slatopolsky. 2001. « Sustained Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway Is Required for Extracellular Calcium Stimulation of Human Osteoblast Proliferation ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (24): 21351-21358. doi:10.1074/jbc.M010921200.
- Hudlicka, et Brown. 1993. « Physical forces and angiogenesis. In: Rubanyi GM, editor. Mechanoreception by the vascular wall ». In *Mechanoreception by the vascular wall.*, Mount Kisco (NY): Futura Publishing Co., Inc, 197-241. Rubanyi GM.
- Hughes-Fulford, M. 2003. « Function of the Cytoskeleton in Gravisensing during Spaceflight ». *Advances in Space Research: The Official Journal of the Committee on Space Research (COSPAR)* 32 (8): 1585-1593.
- Hughes-Fulford, Millie. 2011. « To Infinity ... and beyond! Human Spaceflight and Life Science ». *The FASEB Journal* 25 (9): 2858-2864. doi:10.1096/fj.11-0902ufm.
- Hurtel-Lemaire, Mentaverri, Caudrillier, Cournarie, Wattel, Kamel, Terwilliger, Brown, et Brazier. 2009. « The Calcium-Sensing Receptor Is Involved in Strontium Ranelate-Induced Osteoclast Apoptosis. New Insights into the Associated Signaling Pathways ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (1): 575-584. doi:10.1074/jbc.M801668200.
- Huveneers, et Danen. 2009. « Adhesion Signaling - Crosstalk between Integrins, Src and Rho ». *Journal of Cell Science* 122 (Pt 8): 1059-1069. doi:10.1242/jcs.039446.
- Imajo, Miyatake, Iimura, Miyamoto, et Nishida. 2012. « A Molecular Mechanism That Links Hippo Signalling to the Inhibition of Wnt/ β -Catenin Signalling ». *The EMBO Journal* 31 (5): 1109-1122. doi:10.1038/emboj.2011.487.
- Ingber, D. 1999. « How Cells (might) Sense Microgravity ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 Suppl: S3-15.
- Ingber, Donald E. 2003. « Tensegrity I. Cell Structure and Hierarchical Systems Biology ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 7): 1157-1173.
- Jaffe, et Hall. 2005. « RHO GTPASES: Biochemistry and Biology ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21 (1): 247-269. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721.
- James. 2013. « Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation ». *Scientifica* 2013: 684736. doi:10.1155/2013/684736.
- Jeon, Kim, Kwon, Kim, Park, Kim, et Shin. 2003. « Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Inhibits the Runx2-Mediated Transcription of Osteocalcin in Osteoblasts ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (26): 23270-23277. doi:10.1074/jbc.M211610200.
- Juffer, Bakker, Klein-Nulend, et Jaspers. 2014. « Mechanical Loading by Fluid Shear Stress of Myotube Glycocalyx Stimulates Growth Factor Expression and Nitric Oxide Production ». *Cell Biochemistry and Biophysics* 69 (3): 411-419. doi:10.1007/s12013-013-9812-4.
- Justesen, Mosekilde, Holmes, Stenderup, Gasser, Mullins, Seckl, et Kassem. 2004. « Mice Deficient in 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Lack Bone Marrow Adipocytes, but Maintain Normal Bone Formation ». *Endocrinology* 145 (4): 1916-1925. doi:10.1210/en.2003-1427.
- Karsenty, et Wagner. 2002. « Reaching a Genetic and Molecular Understanding of Skeletal Development ». *Developmental Cell* 2 (4): 389-406.
- Kasten, Müller, Bulnheim, Groll, Bruellhoff, Beck, Steinhoff, Möller, et Rychly. 2010. « Mechanical Integrin Stress and Magnetic Forces Induce Biological Responses in Mesenchymal Stem Cells Which Depend on Environmental Factors ». *Journal of Cellular Biochemistry* 111 (6): 1586-1597. doi:10.1002/jcb.22890.
- Katoh, et Katoh. 2007. « WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13 (14): 4042-4045. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2316.
- Katsumi, Milanini, Kiosses, del Pozo, Kaunas, Chien, Hahn, et Schwartz. 2002. « Effects of Cell Tension on the Small GTPase Rac ». *The Journal of Cell Biology* 158 (1): 153-164. doi:10.1083/jcb.200201105.
- Kawai, et Rosen. 2010. « PPAR γ : A Circadian Transcription Factor in Adipogenesis and Osteogenesis ». *Nature Reviews Endocrinology* 6 (11): 629-636. doi:10.1038/nrendo.2010.155.
- Keipert, Klaus, Heldmaier, et Jastroch. 2010. « UCP1 Ectopically Expressed in Murine Muscle Displays Native Function and Mitigates Mitochondrial Superoxide Production ». *Biochimica et Biophysica Acta* 1797 (2): 324-330. doi:10.1016/j.bbabbio.2009.11.008.
- Koch, Tugues, Li, Gualandi, et Claesson-Welsh. 2011. « Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors ». *The Biochemical Journal* 437 (2): 169-183. doi:10.1042/BJ20110301.
- Koh, Park, Park, Han, Lee, Park, et Koh. 2009. « Activation of PPAR Gamma Induces Profound Multilocularization of Adipocytes in Adult Mouse White Adipose Tissues ». *Experimental & Molecular Medicine* 41 (12): 880-895. doi:10.3858/emmm.2009.41.12.094.

Références bibliographiques

- Kojima, Norose, Tsuchiya, et Sakamoto. 2010. « Mouse 3T3-L1 Cells Acquire Resistance against Oxidative Stress as the Adipocytes Differentiate via the Transcription Factor FoxO ». *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 15 (1): 83-93. doi:10.1007/s10495-009-0415-x.
- Kondrikov, Caldwell, Dong, et Su. 2011. « Reactive Oxygen Species-Dependent RhoA Activation Mediates Collagen Synthesis in Hyperoxic Lung Fibrosis ». *Free Radical Biology & Medicine* 50 (11): 1689-1698. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.020.
- Krings, Rahman, Huang, Lu, Czernik, et Lecka-Czernik. 2012. « Bone marrow fat has brown adipose tissue characteristics, which are attenuated with aging and diabetes ». *Bone* 50 (2): 546-552. doi:10.1016/j.bone.2011.06.016.
- Krishnan, Bryant, et Macdougald. 2006. « Regulation of Bone Mass by Wnt Signaling ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (5): 1202-1209. doi:10.1172/JCI28551.
- Kurpinski, Chu, Hashi, et Li. 2006. « Anisotropic Mechanosensing by Mesenchymal Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (44): 16095-16100. doi:10.1073/pnas.0604182103.
- Lagumdzija, Bucht, Stark, Hulting, et Petersson. 2004. « Arg-Vasopressin Increases Proliferation of Human Osteoblast-like Cells and Decreases Production of Interleukin-6 and Macrophage Colony-Stimulating Factor ». *Regulatory Peptides* 121 (1-3): 41-48. doi:10.1016/j.regpep.2004.04.002.
- Laharrague, Corberand, Cousin, Penicaud, et Casteilla. 1999. « Adipocytes médullaires et hématopoïèse ». *Hématologie* 5 (4): 255-63.
- Lambert, Lapière, et Nusgens. 2007. « Biology of Adherent Cells in Microgravity ». In *Biology in Space and Life on Earth*, édité par Biologist, 123-155. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/9783527617005.ch5/summary>.
- Lang, Thomas F, Leblanc, Evans, et Lu. 2006. « Adaptation of the Proximal Femur to Skeletal Reloading after Long-Duration Spaceflight ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 21 (8): 1224-1230. doi:10.1359/jbmr.060509.
- Lang, Thomas, LeBlanc, Evans, Lu, Genant, et Yu. 2004. « Cortical and Trabecular Bone Mineral Loss from the Spine and Hip in Long-Duration Spaceflight ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19 (6): 1006-1012. doi:10.1359/JBMR.040307.
- Leach, Cintrón, et Krauhs. 1991. « Metabolie Changes Observed in Astronauts ». *The Journal of Clinical Pharmacology* 31 (10): 921-27. doi:10.1002/j.1552-4604.1991.tb03650.x.
- Lecka-Czernik. 2012. « Marrow Fat Metabolism Is Linked to the Systemic Energy Metabolism ». *Bone* 50 (2): 534-539. doi:10.1016/j.bone.2011.06.032.
- Lee, Lim, Lee, et Yang. 2006. « Effects of Hydrogen Peroxide (H₂O₂) on Alkaline Phosphatase Activity and Matrix Mineralization of Odontoblast and Osteoblast Cell Lines ». *Cell Biology and Toxicology* 22 (1): 39-46. doi:10.1007/s10565-006-0018-z.
- Lessey, Guilluy, et Burrige. 2012. « From Mechanical Force to RhoA Activation ». *Biochemistry* 51 (38): 7420-7432. doi:10.1021/bi300758e.
- Letonturier. 2004. « Le ranélate de strontium, nouvelle possibilité de traitement de l'ostéoporose post-ménopausique ». *La Presse Médicale* 33 (5): 358. doi:10.1016/S0755-4982(04)98593-4.
- Li, W., et Keller. 2000. « VEGF Nuclear Accumulation Correlates with Phenotypical Changes in Endothelial Cells ». *Journal of Cell Science* 113 (9): 1525-1534.
- Li, Xuri. 2010. « VEGF-B: A Thing of Beauty ». *Cell Research* 20 (7): 741-744. doi:10.1038/cr.2010.77.
- Li, Xuri, Lee, Tang, Zhang, Arjunan, Li, Hou, Kumar, et Dong. 2009. « VEGF-B: A survival, or an angiogenic factor? ». *Cell Adhesion & Migration* 3 (4): 322-327. doi:10.4161/cam.3.4.9459.
- Li, Ying Jun, Batra, You, Meier, Coe, Yellowley, et Jacobs. 2004. « Oscillatory Fluid Flow Affects Human Marrow Stromal Cell Proliferation and Differentiation ». *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 22 (6): 1283-1289. doi:10.1016/j.orthres.2004.04.002.
- Li, Zhen, Yao, Alini, et Stoddart. 2010. « Chondrogenesis of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Fibrin-Polyurethane Composites Is Modulated by Frequency and Amplitude of Dynamic Compression and Shear Stress ». *Tissue Engineering. Part A* 16 (2): 575-584. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0262.
- Lijnen, Maquoi, Hansen, Van Hoef, Frederix, et Collen. 2002. « Matrix Metalloproteinase Inhibition Impairs Adipose Tissue Development in Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (3): 374-379.
- Lin, Li-Jung, Grimme, Sun, Lu, Gai, Cropek, et Wang. 2013. « The Antagonistic Roles of PDGF and Integrin $\alpha\beta 3$ in Regulating ROS Production at Focal Adhesions ». *Biomaterials* 34 (15): 3807-3815. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.092.

Références bibliographiques

- Lin, Liwen, Chow, et Leng. 2009. « Study of Hydroxyapatite Osteoinductivity with an Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells ». *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 89 (2): 326-335. doi:10.1002/jbm.a.31994.
- Lippuner. 2003. « Medical Treatment of Vertebral Osteoporosis ». *European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 12 Suppl 2 (octobre): S132-141. doi:10.1007/s00586-003-0608-x.
- Liu, Jun, DeYoung, Zhang, Zhang, Cheng, et Saltiel. 2005. « Changes in integrin expression during adipocyte differentiation ». *Cell Metabolism* 2 (3): 165-177. doi:10.1016/j.cmet.2005.08.006.
- Liu, Li-Fen, Shen, Ueno, Patel, et Kraemer. 2011. « Characterization of Age-Related Gene Expression Profiling in Bone Marrow and Epididymal Adipocytes ». *BMC Genomics* 12: 212. doi:10.1186/1471-2164-12-212.
- Liu, Yanqiu, Berendsen, Jia, Lotinun, Baron, Ferrara, et Olsen. 2012. « Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation ». *The Journal of clinical investigation* 122 (9): 3101-3113. doi:10.1172/JCI61209.
- Liu, Yongqing, et Wang. 2008. « Transcriptional Analysis of Normal Human Fibroblast Responses to Microgravity Stress ». *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 6 (1): 29-41. doi:10.1016/S1672-0229(08)60018-2.
- Lu, Ji, Zhang, Zhang, Zhang, An, Liu, et Zheng. 2012. « Resistance to Obesity by Repression of VEGF Gene Expression through Induction of Brown-Like Adipocyte Differentiation ». *Endocrinology* 153 (7): 3123-3132. doi:10.1210/en.2012-1151.
- Lumetti, Mazzotta, Ferrillo, Piergianni, Piemontese, Passeri, Macaluso, et Galli. 2014. « RhoA Controls Wnt Upregulation on Microstructured Titanium Surfaces ». *BioMed Research International* 2014: 401859. doi:10.1155/2014/401859.
- Maack, Kartes, Kilter, Schäfers, Nickenig, Böhm, et Laufs. 2003. « Oxygen Free Radical Release in Human Failing Myocardium Is Associated with Increased Activity of Rac1-GTPase and Represents a Target for Statin Treatment ». *Circulation* 108 (13): 1567-1574. doi:10.1161/01.CIR.0000091084.46500.BB.
- Maccarrone, Bari, Battista, et Finazzi-Agrò. 2001. « The Catalytic Efficiency of Soybean Lipoxygenase-1 Is Enhanced at Low Gravity ». *Biophysical Chemistry* 90 (3): 303-306.
- Maes, Carmeliet, Moermans, Stockmans, Smets, Collen, Bouillon, et Carmeliet. 2002. « Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188 ». *Mechanisms of Development* 111 (1-2): 61-73. doi:10.1016/S0925-4773(01)00601-3.
- Maes, Stockmans, Moermans, Van Looveren, Smets, Carmeliet, Bouillon, et Carmeliet. 2004. « Soluble VEGF Isoforms Are Essential for Establishing Epiphyseal Vascularization and Regulating Chondrocyte Development and Survival ». *The Journal of Clinical Investigation* 113 (2): 188-199. doi:10.1172/JCI19383.
- Mandal, Ganapathy, Gorin, Mahadev, Block, Abboud, Harris, Ghosh-Choudhury, et Ghosh-Choudhury. 2011. « Reactive Oxygen Species Derived from Nox4 Mediate BMP2 Gene Transcription and Osteoblast Differentiation ». *The Biochemical Journal* 433 (2): 393-402. doi:10.1042/BJ20100357.
- MARCUS, et LENGEMANN. 1962. « Absorption of Ca45 and Sr85 from Solid and Liquid Food at Various Levels of the Alimentary Tract of the Rat ». *The Journal of Nutrition* 77 (juin): 155-160.
- Marjoram, Lessey, et Burrige. 2014. « Regulation of RhoA Activity by Adhesion Molecules and Mechanotransduction ». *Current Molecular Medicine* 14 (2): 199-208. doi:10.2174/1566524014666140128104541.
- Marmolino, Manto, Acquaviva, Vergara, Ravella, Monticelli, et Pandolfo. 2010. « PGC-1 α Down-Regulation Affects the Antioxidant Response in Friedreich's Ataxia ». *PLoS ONE* 5 (4): e10025. doi:10.1371/journal.pone.0010025.
- Masala, Taglieri, Chiaravalloti, Calabria, Morini, Iundusi, Tarantino, et Simonetti. 2014. « Thoraco-Lumbar Traumatic Vertebral Fractures Augmentation by Osteo-Conductive and Osteo-Inductive Bone Substitute Containing Strontium-Hydroxyapatite: Our Experience ». *Neuroradiology* 56 (6): 459-466. doi:10.1007/s00234-014-1351-1.
- Matsumura. 2005. « Regulation of Myosin II during Cytokinesis in Higher Eukaryotes ». *Trends in Cell Biology* 15 (7): 371-377. doi:10.1016/j.tcb.2005.05.004.
- Mayr-Wohlfart, Waltenberger, Hausser, Kessler, Günther, Dehio, Puhl, et Brenner. 2002. « Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Chemotactic Migration of Primary Human Osteoblasts ». *Bone* 30 (3): 472-477.
- McBeath, Pirone, Nelson, Bhadriraju, et Chen. 2004. « Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment ». *Developmental cell* 6 (4): 483-495.

Références bibliographiques

- McGarry, Klein-Nulend, Mullender, et Prendergast. 2005. « A Comparison of Strain and Fluid Shear Stress in Stimulating Bone Cell Responses--a Computational and Experimental Study ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (3): 482-484. doi:10.1096/fj.04-2210fje.
- Melville, Harrison, Gross, Forsythe, Trounson, et Mollard. 2006. « Mouse Embryonic Stem Cell Colonisation of Carbonated Apatite Surfaces ». *Biomaterials* 27 (4): 615-622. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.06.028.
- Méndez-Ferrer, Michurina, Ferraro, Mazloom, Macarthur, Lira, Scadden, Ma'ayan, Enikolopov, et Frenette. 2010. « Mesenchymal and Haematopoietic Stem Cells Form a Unique Bone Marrow Niche ». *Nature* 466 (7308): 829-834. doi:10.1038/nature09262.
- Meunier, P, Aaron, Edouard, et Vignon. 1971. « Osteoporosis and the Replacement of Cell Populations of the Marrow by Adipose Tissue. A Quantitative Study of 84 Iliac Bone Biopsies ». *Clinical Orthopaedics and Related Research* 80 (octobre): 147-154.
- Meunier, Pierre J, Roux, Seeman, Ortolani, Badurski, Spector, Cannata, et al. 2004. « The Effects of Strontium Ranelate on the Risk of Vertebral Fracture in Women with Postmenopausal Osteoporosis ». *The New England Journal of Medicine* 350 (5): 459-468. doi:10.1056/NEJMoa022436.
- Meyers, Zayzafoon, Douglas, et McDonald. 2005. « RhoA and Cytoskeletal Disruption Mediate Reduced Osteoblastogenesis and Enhanced Adipogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells in Modeled Microgravity ». *Journal of Bone and Mineral Research* 20 (10): 1858-1866. doi:10.1359/JBMR.050611.
- Midy, et Plouet. 1994. « Vasculotropin/Vascular Endothelial Growth Factor Induces Differentiation in Cultured Osteoblasts ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199 (1): 380-386. doi:10.1006/bbrc.1994.1240.
- Miele, Federici, Sciara, Draghi, Brunori, et Vallone. 2003. « Analysis of the Effect of Microgravity on Protein Crystal Quality: The Case of a Myoglobin Triple Mutant ». *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 59 (Pt 6): 982-988.
- Mitsuishi, Motohashi, et Yamamoto. 2012. « The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism ». *Molecular and Cellular Oncology* 2: 200. doi:10.3389/fonc.2012.00200.
- Mitsuishi, Taguchi, Kawatani, Shibata, Nukiwa, Aburatani, Yamamoto, et Motohashi. 2012. « Nrf2 Redirects Glucose and Glutamine into Anabolic Pathways in Metabolic Reprogramming ». *Cancer Cell* 22 (1): 66-79. doi:10.1016/j.ccr.2012.05.016.
- Miyaniishi, Trindade, Lindsey, Beaupré, Carter, Goodman, Schurman, et Smith. 2006. « Effects of Hydrostatic Pressure and Transforming Growth Factor-Beta 3 on Adult Human Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis *in vitro* ». *Tissue Engineering* 12 (6): 1419-1428. doi:10.1089/ten.2006.12.1419.
- Moon, Kim, Li, Kim, Jeon, Won, Kim, et al. 2013. « Involvement of small GTPase RhoA in the regulation of superoxide production in BV2 cells in response to fibrillar A β peptides ». *Cellular Signalling* 25 (9): 1861-1869. doi:10.1016/j.cellsig.2013.05.023.
- Morel, et Barouki. 1999. « Repression of Gene Expression by Oxidative Stress ». *The Biochemical Journal* 342 Pt 3 (septembre): 481-496.
- Motyl, et Rosen. 2011. « Temperatures rising: brown fat and bone ». *Discovery medicine* 11 (58): 179-185.
- Mouw, Connelly, Wilson, Michael, et Levenston. 2007. « Dynamic Compression Regulates the Expression and Synthesis of Chondrocyte-Specific Matrix Molecules in Bone Marrow Stromal Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25 (3): 655-663. doi:10.1634/stemcells.2006-0435.
- Muniyappa R, Xu R, Ram JL, Sowers JR. Inhibition of Rho protein stimulates iNOS expression in rat vas-cular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278:H1762-8; PMID:10843870
- Myatt, Brosens, et Lam. 2011. « Sense and Sensitivity: FOXO and ROS in Cancer Development and Treatment ». *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (4): 675-687. doi:10.1089/ars.2010.3383.
- Naik, Dothager, Marasa, Lewis, et Piwnica-Worms. 2009. « Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Is Synthetic Lethal to Aberrant {beta}-Catenin Activation in Colon Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (24): 7529-7537. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0336.
- Nakajima, Yamaguchi, Ozutsumi, et Aso. 1998. « Adipose Tissue Extracellular Matrix: Newly Organized by Adipocytes during Differentiation ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 63 (4): 193-200. doi:10.1111/j.1432-0436.1998.00193.x.
- Nakashima, Zhou, Kunkel, Zhang, Deng, Behringer, et de Crombrughe. 2002. « The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation ». *Cell* 108 (1): 17-29.
- Nandi, Kundu, Ghosh, De, et Basu. 2008. « Efficacy of Nano-Hydroxyapatite Prepared by an Aqueous Solution Combustion Technique in Healing Bone Defects of Goat ». *Journal of Veterinary Science* 9 (2): 183-191.

Références bibliographiques

- Negishi-Koga, Shinohara, Komatsu, Bito, Kodama, Friedel, et Takayanagi. 2011. « Suppression of Bone Formation by Osteoclastic Expression of Semaphorin 4D ». *Nature Medicine* 17 (11): 1473-1480. doi:10.1038/nm.2489.
- Neufeld, Cohen, Gengrinovitch, et Poltorak. 1999. « Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptors ». *The FASEB Journal* 13 (1): 9-22.
- Ng. 2008. « The Biology of Vascular Endothelial Cell Growth Factor Isoforms ». In *VEGF in Development*, 1-13. Molecular Biology Intelligence Unit. Springer New York. http://link.springer.com.gate2.inist.fr/chapter/10.1007/978-0-387-78632-2_1.
- Nicogossian, Huntoon, et Pool. 1989. « Space Physiology and Medicine ». In , Lea and Febiger, Philadelphia.
- Nielsen, Slosman, Sørensen, Basse-Cathalinat, De Cassin, Roux, et Meunier. 1999. « Influence of Strontium on Bone Mineral Density and Bone Mineral Content Measurements by Dual X-Ray Absorptiometry ». *Journal of Clinical Densitometry: The Official Journal of the International Society for Clinical Densitometry* 2 (4): 371-379.
- Nimnual, Taylor, et Bar-Sagi. 2003. « Redox-Dependent Downregulation of Rho by Rac ». *Nature Cell Biology* 5 (3): 236-241. doi:10.1038/ncb938.
- Nobes, et Hall. 1995. « Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia ». *Cell* 81 (1): 53-62. doi:10.1016/0092-8674(95)90370-4.
- Numaguchi, Eguchi, Yamakawa, Motley, et Inagami. 1999. « Mechanotransduction of Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cells Requires RhoA and Intact Actin Filaments ». *Circulation Research* 85 (1): 5-11.
- O'Connor, et Gomez. 2013. « Cell Adhesion and Shape Regulate TGF-Beta1-Induced Epithelial-Myofibroblast Transition via MRTF-A Signaling ». Édité par Engler. *PLoS ONE* 8 (12): e83188. doi:10.1371/journal.pone.0083188.
- Obi, Masuda, Shizuno, Sato, Yamamoto, Ando, Abe, et Asahara. 2012. « Fluid Shear Stress Induces Differentiation of Circulating Phenotype Endothelial Progenitor Cells ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 303 (6): C595-606. doi:10.1152/ajpcell.00133.2012.
- Ohashi, Nagata, Maekawa, Ishizaki, Narumiya, et Mizuno. 2000. « RhoAssociated Kinase ROCK Activates LIM-Kinase 1 by Phosphorylation at Threonine 508 within the Activation Loop ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (5): 3577-3582.
- Okuno, Matsuda, Kobayashi, Morita, Suzuki, Fukuhara, Komuro, Shimabukuro, et Shimomura. 2008. « Adipose Expression of Catalase Is Regulated via a Novel Remote PPARgamma-Responsive Region ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366 (3): 698-704. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.001.
- Olson, Ashworth, et Hall. 1995. « An Essential Role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in Cell Cycle Progression through G1 ». *Science (New York, N.Y.)* 269 (5228): 1270-1272.
- Onishi, Fujita, Yoshikawa, et Yamashita. 2013. « Inhibition of Rac1 Promotes BMP-2-Induced Osteoblastic Differentiation ». *Cell Death & Disease* 4 (6): e698. doi:10.1038/cddis.2013.226.
- Otomo, Sakai, Uchida, Tanaka, Watanuki, Moriwaki, Niida, et Nakamura. 2007. « Flt-1 Tyrosine Kinase-Deficient Homozygous Mice Result in Decreased Trabecular Bone Volume with Reduced Osteogenic Potential ». *Bone* 40 (6): 1494-1501. doi:10.1016/j.bone.2007.02.007.
- Owen, M., et Friedenstein. 1988. « Stromal Stem Cells: Marrow-Derived Osteogenic Precursors ». *Ciba Foundation Symposium* 136: 42-60.
- Owen, T. A., Aronow, Shalhoub, Barone, Wilming, Tassinari, Kennedy, Pockwinse, Lian, et Stein. 1990. « Progressive Development of the Rat Osteoblast Phenotype *in vitro*: Reciprocal Relationships in Expression of Genes Associated with Osteoblast Proliferation and Differentiation during Formation of the Bone Extracellular Matrix ». *Journal of Cellular Physiology* 143 (3): 420-430. doi:10.1002/jcp.1041430304.
- Palou, Sánchez, et Picó. 2009. « Nutrient–Gene Interactions in Early Life Programming: Leptin in Breast Milk Prevents Obesity Later on in Life ». In *Early Nutrition Programming and Health Outcomes in Later Life*, édité par Koletzko, Decsi, Molnár, et Hunt, 95-104. Advances in Experimental Medicine and Biology 646. Springer Netherlands. http://link.springer.com.gate2.inist.fr/chapter/10.1007/978-1-4020-9173-5_10.
- Pan, Yang, Guo, Shi, Shen, Zheng, Chen, Xu, Xi, et Wang. 2008. « Effects of Hindlimb Unloading on Ex Vivo Growth and Osteogenic/adipogenic Potentials of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Rats ». *Stem Cells and Development* 17 (4): 795-804. doi:10.1089/scd.2008.0254.
- Peng, Zhou, Luk, Cheung, Li, Lam, Zhou, et Lu. 2009. « Strontium Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Through the Ras/MAPK Signaling Pathway ». *Cellular Physiology and Biochemistry* 23 (1-3): 165-174. doi:10.1159/000204105.

- Pi, et Quarles. 2004. « A Novel Cation-Sensing Mechanism in Osteoblasts Is a Molecular Target for Strontium ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19 (5): 862-869. doi:10.1359/JBMR.040114.
- Pi, Zhang, Lei, Huang, Zhu, Zhang, Shen, Deng, et Quarles. 2010. « Impaired Osteoblast Function in GPRC6A Null Mice ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25 (5): 1092-1102. doi:10.1359/jbmr.091037.
- Pinney, et Emerson. 1989. « 10T1/2 cells: an *in vitro* model for molecular genetic analysis of mesodermal determination and differentiation ». *Environmental health perspectives* 80 (mars): 221-227.
- Pitsillides, Rawlinson, Suswillo, Bourrin, Zaman, et Lanyon. 1995. « Mechanical Strain-Induced NO Production by Bone Cells: A Possible Role in Adaptive Bone (re)modeling? » *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (15): 1614-1622.
- Pittenger, Mackay, Beck, Jaiswal, Douglas, Mosca, Moorman, Simonetti, Craig, et Marshak. 1999. « Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411): 143-147.
- Plouët, Moro, Bertagnolli, Coldeboeuf, Mazarguil, Clamens, et Bayard. 1997. « Extracellular Cleavage of the Vascular Endothelial Growth Factor 189-Amino Acid Form by Urokinase Is Required for Its Mitogenic Effect ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (20): 13390-13396.
- Pollard. 1965. « Theoretical Studies on Living Systems in the Absence of Mechanical Stress ». *Journal of Theoretical Biology* 8 (1): 113-123.
- Poltorak, Cohen, Sivan, Kandelis, Spira, Vlodavsky, Keshet, et Neufeld. 1997. « VEGF145, a Secreted Vascular Endothelial Growth Factor Isoform That Binds to Extracellular Matrix ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (11): 7151-7158.
- Pors Nielsen. 2004. « The biological role of strontium ». *Bone* 35 (3): 583-588. doi:10.1016/j.bone.2004.04.026.
- Prisby, Guignandon, Vanden-Bossche, Mac-Way, Linossier, Thomas, Laroche, et al. 2011. « Intermittent PTH(1-84) Is Osteoanabolic but Not Osteoangiogenic and Relocates Bone Marrow Blood Vessels Closer to Bone-Forming Sites ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26 (11): 2583-2596. doi:10.1002/jbmr.459.
- Putnam, Cunningham, Pillemer, et Mooney. 2003. « External Mechanical Strain Regulates Membrane Targeting of Rho GTPases by Controlling Microtubule Assembly ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 284 (3): C627-639. doi:10.1152/ajpcell.00137.2002.
- Querido, Campos, Martins Ferreira, San Gil, Rossi, et Farina. 2014. « Strontium Ranelate Changes the Composition and Crystal Structure of the Biological Bone-like Apatite Produced in Osteoblast Cell Cultures ». *Cell and Tissue Research*, mai. doi:10.1007/s00441-014-1901-1.
- Raftopoulou, et Hall. 2004. « Cell Migration: Rho GTPases Lead the Way ». *Developmental Biology* 265 (1): 23-32.
- Raisz. 2005. « Pathogenesis of Osteoporosis: Concepts, Conflicts, and Prospects ». *The Journal of Clinical Investigation* 115 (12): 3318-3325. doi:10.1172/JCI27071.
- Reznikoff, Brankow, et Heidelberger. 1973. « Establishment and Characterization of a Cloned Line of C3H Mouse Embryo Cells Sensitive to Postconfluence Inhibition of Division ». *Cancer Research* 33 (12): 3231-3238.
- Rice, L, et Alfrey. 2000. « Modulation of Red Cell Mass by Neocytolysis in Space and on Earth ». *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 441 (2-3 Suppl): R91-94.
- Rice, Lawrence, et Alfrey. 2005. « The Negative Regulation of Red Cell Mass by Neocytolysis: Physiologic and Pathophysiologic Manifestations ». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 15 (6): 245-250. doi:10.1159/000087234.
- Rickard, Wang, Rodriguez-Rojas, Wu, Trice, Hoffman, Votta, Stroup, Kumar, et Nuttall. 2006. « Intermittent Treatment with Parathyroid Hormone (PTH) as Well as a Non-Peptide Small Molecule Agonist of the PTH1 Receptor Inhibits Adipocyte Differentiation in Human Bone Marrow Stromal Cells ». *Bone* 39 (6): 1361-1372. doi:10.1016/j.bone.2006.06.010.
- Riddle, Taylor, Genetos, et Donahue. 2006. « MAP Kinase and Calcium Signaling Mediate Fluid Flow-Induced Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 290 (3): C776-784. doi:10.1152/ajpcell.00082.2005.
- Ridley, A J, et Hall. 1992. « The Small GTP-Binding Protein Rho Regulates the Assembly of Focal Adhesions and Actin Stress Fibers in Response to Growth Factors ». *Cell* 70 (3): 389-399.
- Ridley, Anne J. 2006. « Rho GTPases and Actin Dynamics in Membrane Protrusions and Vesicle Trafficking ». *Trends in Cell Biology* 16 (10): 522-529. doi:10.1016/j.tcb.2006.08.006.
- Rijken, de Groot, Briegleb, Kruijer, Verkleij, Boonstra, et de Laat. 1991. « Epidermal Growth Factor-Induced Cell Rounding Is Sensitive to Simulated Microgravity ». *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 62 (1): 32-36.

Références bibliographiques

- Rizzoli, Brigitte Uebelhart et René. 2011. « Ostéoporose ». *Nouveautés en médecine 2010 (deuxième partie)* Volume 278 (2): 138-144.
- Rizzoli, R, Chapurlat, Laroche, Krieg, Thomas, Frieling, Boutroy, Laib, Bock, et Felsenberg. 2012. « Effects of Strontium Ranelate and Alendronate on Bone Microstructure in Women with Osteoporosis. Results of a 2-Year Study ». *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 23 (1): 305-315. doi:10.1007/s00198-011-1758-z.
- Rosen, Ackert-Bicknell, Rodriguez, et Pino. 2009. « Marrow Fat and the Bone Microenvironment: Developmental, Functional, and Pathological Implications ». *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 19 (2): 109-124.
- Rousset, Alves-Guerra, Mozo, Miroux, Cassard-Doulcier, Bouillaud, et Ricquier. 2004. « The Biology of Mitochondrial Uncoupling Proteins ». *Diabetes* 53 Suppl 1 (février): S130-135.
- Rowlands, George, et Cooper-White. 2008. « Directing Osteogenic and Myogenic Differentiation of MSC: Interplay of Stiffness and Adhesive Ligand Presentation ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 295 (4): C1037-1044. doi:10.1152/ajpcell.67.2008.
- Roy, Fielding, Bandyopadhyay, et Bose. 2013. « Effects of Zinc and Strontium Substitution in Tricalcium Phosphate on Osteoclast Differentiation and Resorption ». *Biomaterials Science* 1 (1). doi:10.1039/C2BM00012A.
- Sacchetti, Funari, Michienzi, Di Cesare, Piersanti, Saggio, Tagliafico, et al. 2007. « Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment ». *Cell* 131 (2): 324-336. doi:10.1016/j.cell.2007.08.025.
- Saidak, Haÿ, Marty, Barbara, et Marie. 2012. « Strontium Ranelate Rebalances Bone Marrow Adipogenesis and Osteoblastogenesis in Senescent Osteopenic Mice through NFATc/Maf and Wnt Signaling ». *Aging Cell* 11 (3): 467-474. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00804.x.
- Saidak, et Marie. 2012. « Strontium Signaling: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications in Osteoporosis ». *Pharmacology & Therapeutics* 136 (2): 216-226. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.07.009.
- Saitoh, Xiao, Mizuno, Kato, Aoshima, Taira, Kokubo, et Miwa. 2010. « Novel Polyhydroxylated Fullerene Suppresses Intracellular Oxidative Stress Together with Repression of Intracellular Lipid Accumulation during the Differentiation of OP9 Preadipocytes into Adipocytes ». *Free Radical Research* 44 (9): 1072-1081. doi:10.3109/10715762.2010.499905.
- Samuel, Fan, Dang, Xia, Gaur, et Ellis. 2011. « Intracrine Vascular Endothelial Growth Factor Signaling in Survival and Chemoresistance of Human Colorectal Cancer Cells ». *Oncogene* 30 (10): 1205-1212. doi:10.1038/onc.2010.496.
- Sander, Klooster, Delft, Kammen, et Collard. 1999. « Rac Downregulates Rho Activity Reciprocal Balance between Both Gtpases Determines Cellular Morphology and Migratory Behavior ». *The Journal of Cell Biology* 147 (5): 1009-1022. doi:10.1083/jcb.147.5.1009.
- Santiago-Mora, Casado-Díaz, De Castro, et Quesada-Gómez. 2011. « Oleuropein Enhances Osteoblastogenesis and Inhibits Adipogenesis: The Effect on Differentiation in Stem Cells Derived from Bone Marrow ». *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 22 (2): 675-684. doi:10.1007/s00198-010-1270-x.
- Schneller, Vuori, et Ruoslahti. 1997. « Alpha β 3 Integrin Associates with Activated Insulin and PDGF β Receptors and Potentiates the Biological Activity of PDGF ». *The EMBO Journal* 16 (18): 5600-5607. doi:10.1093/emboj/16.18.5600.
- Schröder, Wandzioch, Helmcke, et Brandes. 2009. « Nox4 Acts as a Switch between Differentiation and Proliferation in Preadipocytes ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (2): 239-245. doi:10.1161/ATVBAHA.108.174219.
- Schwarzkopf, Olivieri, et Jaffe. 2012. « Simultaneous Bilateral Total Hip Arthroplasty with Hydroxyapatite-Coated Implants: A 20-Year Follow-Up ». *The Journal of Arthroplasty* 27 (7): 1364-1369. doi:10.1016/j.arth.2011.10.029.
- Sechler, Rao, Cumiskey, Vega-Colón, Smith, Murata, et Schwarzbauer. 2001. « A Novel Fibronectin Binding Site Required for Fibronectin Fibril Growth during Matrix Assembly ». *The Journal of Cell Biology* 154 (5): 1081-1088. doi:10.1083/jcb.200102034.
- Sekine, Sakama, et Hamada. 2013. « Evaluation of Strontium Introduced Apatite Cement as the Injectable Bone Substitute Developments ». *Conference Proceedings: ... Annual International Conference of the IEEE*

Références bibliographiques

- Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference 2013*: 858-861. doi:10.1109/EMBC.2013.6609636.
- Servotte, Zhang, Lambert, Ho, Chometon, Eckes, Krieg, Lapière, Nusgens, et Aumailley. 2006. « Establishment of Stable Human Fibroblast Cell Lines Constitutively Expressing Active Rho-GTPases ». *Protoplasma* 229 (2-4): 215-220. doi:10.1007/s00709-006-0204-0.
- Settleman. 2004. « Tension Precedes Commitment—Even for a Stem Cell ». *Molecular Cell* 14 (2): 148-150. doi:10.1016/S1097-2765(04)00207-2.
- Sharp, Lee, et Goldstein. 2009. « Effect of Low-Frequency Pulsatile Flow on Expression of Osteoblastic Genes by Bone Marrow Stromal Cells ». *Annals of Biomedical Engineering* 37 (3): 445-453. doi:10.1007/s10439-008-9632-7.
- Shepherd, Shepherd, et Best. 2012. « Substituted Hydroxyapatites for Bone Repair ». *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 23 (10): 2335-2347. doi:10.1007/s10856-012-4598-2.
- Sheu, et Cauley. 2011. « The Role of Bone Marrow and Visceral Fat on Bone Metabolism ». *Current Osteoporosis Reports* 9 (2): 67-75. doi:10.1007/s11914-011-0051-6.
- Shimi, Butin-Israeli, Adam, et Goldman. 2010. « Nuclear Lamins in Cell Regulation and Disease ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 75: 525-531. doi:10.1101/sqb.2010.75.045.
- Shin, Swift, Ivanovska, Spinler, Buxboim, et Discher. 2013. « Mechanobiology of Bone Marrow Stem Cells: From Myosin-II Forces to Compliance of Matrix and Nucleus in Cell Forms and Fates ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 86 (3): 77-86. doi:10.1016/j.diff.2013.05.001.
- Shi-wen, Thompson, Khan, Liu, Murphy-Marshman, Baron, Denton, Leask, et Abraham. 2012. « Focal Adhesion Kinase and Reactive Oxygen Species Contribute to the Persistent Fibrotic Phenotype of Lesional Scleroderma Fibroblasts ». *Rheumatology (Oxford, England)* 51 (12): 2146-2154. doi:10.1093/rheumatology/kes234.
- Sibonga, Evans, Sung, Spector, Lang, Oganov, Bakulin, Shackelford, et LeBlanc. 2007. « Recovery of Spaceflight-Induced Bone Loss: Bone Mineral Density after Long-Duration Missions as Fitted with an Exponential Function ». *Bone* 41 (6): 973-978. doi:10.1016/j.bone.2007.08.022.
- Sila-Asna, Bunyaratvej, Maeda, Kitaguchi, et Bunyaratvej. 2007. « Osteoblast Differentiation and Bone Formation Gene Expression in Strontium-Inducing Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell ». *The Kobe Journal of Medical Sciences* 53 (1-2): 25-35.
- Silver, Murrills, et Etherington. 1988. « Microelectrode Studies on the Acid Microenvironment beneath Adherent Macrophages and Osteoclasts ». *Experimental Cell Research* 175 (2): 266-276.
- Sit, et Manser. 2011. « Rho GTPases and Their Role in Organizing the Actin Cytoskeleton ». *Journal of Cell Science* 124 (5): 679-683. doi:10.1242/jcs.064964.
- Smalt, Mitchell, Howard, et Chambers. 1997. « Induction of NO and Prostaglandin E2 in Osteoblasts by Wall-Shear Stress but Not Mechanical Strain ». *The American Journal of Physiology* 273 (4 Pt 1): E751-758.
- Song, Heesang, Cha, Song, Kim, Chang, Lim, Choi, et al. 2010. « Reactive Oxygen Species Inhibit Adhesion of Mesenchymal Stem Cells Implanted into Ischemic Myocardium via Interference of Focal Adhesion Complex ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28 (3): 555-563. doi:10.1002/stem.302.
- Song, Jonathan W., Daubriac, Tse, Bazou, et Munn. 2012. « RhoA Mediates Flow-Induced Endothelial Sprouting in a 3-D Tissue Analogue of Angiogenesis ». *Lab on a Chip* 12 (23): 5000-5006. doi:10.1039/C2LC40389G.
- Song, Seung-Yong, Chung, et Sung. 2010. « The Pivotal Role of VEGF in Adipose-Derived-Stem-Cell-Mediated Regeneration ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 10 (11): 1529-1537. doi:10.1517/14712598.2010.522987.
- Sordella, Jiang, Chen, Curto, et Settleman. 2003. « Modulation of Rho GTPase Signaling Regulates a Switch between Adipogenesis and Myogenesis ». *Cell* 113 (2): 147-158. doi:10.1016/S0092-8674(03)00271-X.
- Stein. 2002. « Space Flight and Oxidative Stress ». *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 18 (10): 867-871.
- Stepan. 2013. « Strontium Ranelate: In Search for the Mechanism of Action ». *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 1-7. doi:10.1007/s00774-013-0494-1.
- Stolzing, Jones, McGonagle, et Scutt. 2008. « Age-Related Changes in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Consequences for Cell Therapies ». *Mechanisms of Ageing and Development* 129 (3): 163-173. doi:10.1016/j.mad.2007.12.002.
- St-Pierre, Drori, Uldry, Silvaggi, Rhee, Jäger, Handschin, et al. 2006. « Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators ». *Cell* 127 (2): 397-408. doi:10.1016/j.cell.2006.09.024.

- Sumanasinghe, Bernacki, et Loba. 2006. « Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Collagen Matrices: Effect of Uniaxial Cyclic Tensile Strain on Bone Morphogenetic Protein (BMP-2) mRNA Expression ». *Tissue Engineering* 12 (12): 3459-3465. doi:10.1089/ten.2006.12.3459.
- Sun, Breslin, Zhu, Yuan, et Wu. 2006. « Rho and ROCK Signaling in VEGF-Induced Microvascular Endothelial Hyperpermeability ». *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 13 (3): 237-247. doi:10.1080/10739680600556944.
- Sushkov, Portugalov, Rudneva, Bobkova, et Iordanishvili. 1976. « [Results of mammalian cell culture exposure on artificial earth satellites] ». *Kosmicheskaja Biologija I Aviakosmicheskaja Meditsina* 10 (2): 58-63.
- Swift, Ivanovska, Buxboim, Harada, Dingal, Pinter, Pajeroski, et al. 2013. « Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6149): 1240104. doi:10.1126/science.1240104.
- Taddei, Parri, Mello, Catalano, Levine, Rauegi, Ramponi, et Chiarugi. 2007. « Integrin-Mediated Cell Adhesion and Spreading Engage Different Sources of Reactive Oxygen Species ». *Antioxidants & Redox Signaling* 9 (4): 469-481. doi:10.1089/ars.2006.1392.
- Takada, Kouzmenko, et Kato. 2009. « Wnt and PPAR γ Signaling in Osteoblastogenesis and Adipogenesis ». *Nature Reviews Rheumatology* 5 (8): 442-447. doi:10.1038/nrrheum.2009.137.
- Takahashi, Sasaki, Tsouderos, et Suda. 2003. « S 12911-2 Inhibits Osteoclastic Bone Resorption *in vitro* ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18 (6): 1082-1087. doi:10.1359/jbmr.2003.18.6.1082.
- Tam, Duda, Perentes, Quadri, Fukumura, et Jain. 2009. « Blockade of VEGFR2 and Not VEGFR1 Can Limit Diet-Induced Fat Tissue Expansion: Role of Local versus Bone Marrow-Derived Endothelial Cells ». *PLoS ONE* 4 (3): e4974. doi:10.1371/journal.pone.0004974.
- Tang, Otto, et Lane. 2004. « Commitment of C3H10T1/2 Pluripotent Stem Cells to the Adipocyte Lineage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (26): 9607-9611. doi:10.1073/pnas.0403100101.
- Terzyan, Bourne, Ramsland, Bourne, et Edmundson. 2003. « Comparison of the Three-Dimensional Structures of a Human Bence-Jones Dimer Crystallized on Earth and Aboard US Space Shuttle Mission STS-95 ». *Journal of Molecular Recognition: JMR* 16 (2): 83-90. doi:10.1002/jmr.610.
- Testard, Ricoul, Hoffschir, Flury-Herard, Dutrillaux, Fedorenko, Gerasimenko, et Sabatier. 1996. « Radiation-Induced Chromosome Damage in Astronauts' Lymphocytes ». *International Journal of Radiation Biology* 70 (4): 403-411.
- Tfelt-Hansen. 2008. « The role of calcium-sensing receptor and signalling pathways in the pathophysiology in two *in vitro* models of malignant hypercalcemia: The rat rice H-500 leydig testis cancer and prostate cancer (PC-3) cells. Expression and regulation of pituitary tumor transforming gene in leydig testis cancer and astrocyte and astrocytoma cells ». *Danish Medical Bulletin*.
- Thews, Lambert, Kelleher, Biesalski, Vaupel, et Frank. 2009. « Impact of Reactive Oxygen Species on the Expression of Adhesion Molecules *in vivo* ». In *Oxygen Transport to Tissue XXX*, édité par Liss, Hansell, Bruley, et Harrison, 95-100. Advances in Experimental Medicine and Biology 645. Springer US. http://link.springer.com.gate2.inist.fr/chapter/10.1007/978-0-387-85998-9_15.
- Tiraby, Tavernier, Lefort, Larrouy, Bouillaud, Ricquier, et Langin. 2003. « Acquirement of Brown Fat Cell Features by Human White Adipocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (35): 33370-33376. doi:10.1074/jbc.M305235200.
- Titushkin, et Cho. 2007. « Modulation of Cellular Mechanics during Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells ». *Biophysical Journal* 93 (10): 3693-3702. doi:10.1529/biophysj.107.107797.
- Tombran-Tink, et Barnstable. 2004. « Osteoblasts and Osteoclasts Express PEDF, VEGF-A Isoforms, and VEGF Receptors: Possible Mediators of Angiogenesis and Matrix Remodeling in the Bone ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316 (2): 573-579. doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.076.
- Trappmann, Gautrot, Connelly, Strange, Li, Oyen, Cohen Stuart, et al. 2012. « Extracellular-Matrix Tethering Regulates Stem-Cell Fate ». *Nature Materials* 11 (7): 642-649. doi:10.1038/nmat3339.
- Tschumperlin, Liu, et Tager. 2013. « Biomechanical regulation of mesenchymal cell function. [Miscellaneous Article] ». *Current Opinion in Rheumatology January 2013* 25 (1): 92-100. doi:10.1097/BOR.0b013e32835b13cd.
- Tzima. 2006. « Role of Small GTPases in Endothelial Cytoskeletal Dynamics and the Shear Stress Response ». *Circulation Research* 98 (2): 176-185. doi:10.1161/01.RES.0000200162.94463.d7.
- Ullrich, Huber, et Lang. 2008. « Signal Transduction in Cells of the Immune System in Microgravity ». *Cell Communication and Signaling: CCS* 6: 9. doi:10.1186/1478-811X-6-9.

- Ushio-Fukai. 2008. « Compartmentalization of Redox Signaling Through NADPH Oxidase–Derived ROS ». *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (6): 1289-1299. doi:10.1089/ars.2008.2333.
- Vahedi-Faridi, Porta, et Borgstahl. 2003. « Improved Three-Dimensional Growth of Manganese Superoxide Dismutase Crystals on the International Space Station ». *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 59 (Pt 2): 385-388.
- Valle, Álvarez-Barrientos, Arza, Lamas, et Monsalve. 2005. « PGC-1 α Regulates the Mitochondrial Antioxidant Defense System in Vascular Endothelial Cells ». *Cardiovascular Research* 66 (3): 562-573. doi:10.1016/j.cardiores.2005.01.026.
- Van Driel, et van Leeuwen. 2014. « Vitamin D Endocrine System and Osteoblasts ». *BoneKey Reports* 3 (février). doi:10.1038/bonekey.2013.227.
- Van Essen. 1997. « A Tension-Based Theory of Morphogenesis and Compact Wiring in the Central Nervous System ». *Nature* 385 (6614): 313-318. doi:10.1038/385313a0.
- Van Nieuw Amerongen, Koolwijk, Versteilen, et van Hinsbergh. 2003. « Involvement of RhoA/Rho Kinase Signaling in VEGF-Induced Endothelial Cell Migration and Angiogenesis *in vitro* ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (2): 211-217.
- VandeVord, Nasser, et Wooley. 2005. « Immunological Responses to Bone Soluble Proteins in Recipients of Bone Allografts ». *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 23 (5): 1059-1064. doi:10.1016/j.orthres.2004.12.004.
- Vempati, Popel, et Mac Gabhann. 2014. « Extracellular regulation of VEGF: Isoforms, proteolysis, and vascular patterning ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 25 (1): 1-19. doi:10.1016/j.cytogfr.2013.11.002.
- Versari, Longinotti, Barengi, Maier, et Bradamante. 2013. « The Challenging Environment on Board the International Space Station Affects Endothelial Cell Function by Triggering Oxidative Stress through Thioredoxin Interacting Protein Overexpression: The ESA-SPHINX Experiment ». *The FASEB Journal* 27 (11): 4466-4475. doi:10.1096/fj.13-229195.
- Vico, Collet, Guignandon, Lafage-Proust, Thomas, Rehailia, et Alexandre. 2000. « Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts ». *The Lancet* 355 (9215): 1607-1611. doi:10.1016/S0140-6736(00)02217-0.
- Vidal, Gunaratnam, Tong, et Duque. 2012. « Biochemical changes induced by strontium ranelate in differentiating adipocytes ». *Biochimie*. doi:10.1016/j.biochi.2012.11.008.
- Villa, Wang, Huang, Rowe, et Wei. 2014. « Bone Tissue Engineering with a Collagen–hydroxyapatite Scaffold and Culture Expanded Bone Marrow Stromal Cells ». *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, juin, n/a-n/a. doi:10.1002/jbm.b.33225.
- Visse, et Nagase. 2003. « Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry ». *Circulation Research* 92 (8): 827-839. doi:10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.
- Vogel. 1975. « Bone Mineral Measurement: Skylab Experiment M-078 ». *Acta Astronautica* 2 (1-2): 129-139.
- Von Maltzahn, Chang, Bentzinger, et Rudnicki. 2012. « Wnt signaling in myogenesis ». *Trends in Cell Biology* 22 (11): 602-609. doi:10.1016/j.tcb.2012.07.008.
- Wagner, He, Chen, Zuo, Zhang, Shi, Luo, et al. 2010. « Therapeutic Implications of PPAR γ in Human Osteosarcoma ». *PPAR Research* 2010 (février): e956427. doi:10.1155/2010/956427.
- Wan, Cho, Yokota, et Na. 2013. « Rac1 and Cdc42 GTPases regulate shear stress-driven β -catenin signaling in osteoblasts ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 433 (4): 502-507. doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.020.
- Wang, B. L., Dai, Quan, Zhu, Zheng, Zhang, Guo, Guo, Zhang, et Qiu. 2006. « Parathyroid Hormone Regulates Osterix and Runx2 mRNA Expression Predominantly through Protein Kinase A Signaling in Osteoblast-like Cells ». *Journal of Endocrinological Investigation* 29 (2): 101-108.
- Wang, D S, Miura, Demura, et Sato. 1997. « Anabolic Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Osteoblasts Are Enhanced by Vascular Endothelial Growth Factor Produced by Osteoblasts and by Growth Factors Produced by Endothelial Cells ». *Endocrinology* 138 (7): 2953-2962.
- Wang, Hao, Riha, Yan, Li, Chai, Yang, Yao, et Chen. 2005. « Shear Stress Induces Endothelial Differentiation From a Murine Embryonic Mesenchymal Progenitor Cell Line ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (9): 1817-1823. doi:10.1161/01.ATV.0000175840.90510.a8.
- Wang, Nan, Zhang, Wang, Zhang, Mao, Zhuang, Tang, Luo, Zhou, et Zhang. 2013. « Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial differentiation from mesenchymal stem cells via Rho/myocardin-related transcription factor-A signaling pathway ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (7): 1447-1456. doi:10.1016/j.biocel.2013.04.021.

Références bibliographiques

- Wang, Nanding, Wang, Chen, Zhang, Xie, Li, Ma, Wang, et Wang. 2014. « The Simulated Microgravity Enhances Multipotential Differentiation Capacity of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells ». *Cytotechnology*. doi:10.1007/s10616-013-9544-8.
- Wang, Y., Zang, Liu, Wu, Maass, Dulan, Shaul, et al. 2011. « Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species ». *AJP: Cell Physiology* 301 (3): C695-C704. doi:10.1152/ajpcell.00322.2010.
- Watanabe, Noritake, et Kaibuchi. 2005. « Regulation of Microtubules in Cell Migration ». *Trends in Cell Biology* 15 (2): 76-83. doi:10.1016/j.tcb.2004.12.006.
- Weiner, Parazynski, et Tasciotti. 2012. « Osteoporosis in Microgravity Environments ». In *Osteoporosis*, édité par Dionyssiotis. InTech. <http://www.intechopen.com/books/osteoporosis/osteoporosis-in-microgravity-environments>.
- Whyte. 2010. « Physiological Role of Alkaline Phosphatase Explored in Hypophosphatasia ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192 (mars): 190-200. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05387.x.
- Wierzbicka-Patynowski, et Schwarzbauer. 2003. « The Ins and Outs of Fibronectin Matrix Assembly ». *Journal of Cell Science* 116 (16): 3269-3276. doi:10.1242/jcs.00670.
- Williams, Kuipers, Mukai, et Thirsk. 2009. « Acclimation during space flight: effects on human physiology ». *Canadian Medical Association Journal* 180 (13): 1317-1323. doi:10.1503/cmaj.090628.
- Winer, Janmey, McCormick, et Funaki. 2009. « Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Become Quiescent on Soft Substrates but Remain Responsive to Chemical or Mechanical Stimuli ». *Tissue Engineering. Part A* 15 (1): 147-154. doi:10.1089/ten.tea.2007.0388.
- Winslow, Pan, Starbuck, Gallo, Deng, Karsenty, et Crabtree. 2006. « Calcineurin/NFAT Signaling in Osteoblasts Regulates Bone Mass ». *Developmental Cell* 10 (6): 771-782. doi:10.1016/j.devcel.2006.04.006.
- Woodbury, Schwarz, Prockop, et Black. 2000. « Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neurons ». *Journal of Neuroscience Research* 61 (4): 364-370.
- Woodruff, Jones, Farrar, Grant, et Scotchford. 2007. « Human Osteoblast Cell Spreading and Vinculin Expression upon Biomaterial Surfaces ». *Journal of Molecular Histology* 38 (5): 491-499. doi:10.1007/s10735-007-9142-1.
- Wright, Maroulakou, Eldridge, Liby, Sridharan, Tschlis, et Muise-Helmericks. 2008. « VEGF Stimulation of Mitochondrial Biogenesis: Requirement of AKT3 Kinase ». *The FASEB Journal* 22 (9): 3264-3275. doi:10.1096/fj.08-106468.
- Xiao, Jiang, Thomas, Benson, Guan, Karsenty, et Franceschi. 2000. « MAPK Pathways Activate and Phosphorylate the Osteoblast-Specific Transcription Factor, Cbfa1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (6): 4453-4459.
- Xiong, et O'Brien. 2012. « Osteocyte RANKL: New Insights into the Control of Bone Remodeling ». *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27 (3): 499-505. doi:10.1002/jbmr.1547.
- Yamamoto, Marui, Sakai, Morii, Kozaki, Ikai, Imamura, et Narumiya. 1993. « ADP-Ribosylation of the rhoA Gene Product by Botulinum C3 Exoenzyme Causes Swiss 3T3 Cells to Accumulate in the G1 Phase of the Cell Cycle ». *Oncogene* 8 (6): 1449-1455.
- Yao, Peng, et Ding. 2013. « Effects of aspect ratios of stem cells on lineage commitments with and without induction media ». *Biomaterials* 34 (4): 930-939. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.052.
- Yoo, Chang, et Rho. 1999. « Induction of the Rat Cu/Zn Superoxide Dismutase Gene through the Peroxisome Proliferator-Responsive Element by Arachidonic Acid ». *Gene* 234 (1): 87-91.
- Yu, Wang, Peng, Jiang, Xia, Huang, Rowe, et Wei. 2013. « The Effect of Fresh Bone Marrow Cells on Reconstruction of Mouse Calvarial Defect Combined with Calvarial Osteoprogenitor Cells and Collagen-Apatite Scaffold ». *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 7 (12): 974-983. doi:10.1002/term.1490.
- Yu, Xia, Wang, Peng, Jiang, Huang, Rowe, et Wei. 2012. « Controlling the Structural Organization of Regenerated Bone by Tailoring Tissue Engineering Scaffold Architecture ». *Journal of Materials Chemistry* 22 (19): 9721-9730. doi:10.1039/C2JM30332A.
- Zambuzzi, Ferreira, Granjeiro, et Aoyama. 2011. « Biological Behavior of Pre-Osteoblasts on Natural Hydroxyapatite: A Study of Signaling Molecules from Attachment to Differentiation ». *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 97 (2): 193-200. doi:10.1002/jbm.a.32933.
- Zayzafoon, Gathings, et McDonald. 2004. « Modeled Microgravity Inhibits Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells and Increases Adipogenesis ». *Endocrinology* 145 (5): 2421-2432. doi:10.1210/en.2003-1156.

Références bibliographiques

- Zayzafoon, Meyers, et McDonald. 2005. « Microgravity: The Immune Response and Bone ». *Immunological Reviews* 208 (1): 267-80. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00330.x.
- Zelzer, McLean, Ng, Fukai, Reginato, Lovejoy, D'Amore, et Olsen. 2002. « Skeletal Defects in VEGF(120/120) Mice Reveal Multiple Roles for VEGF in Skeletogenesis ». *Development (Cambridge, England)* 129 (8): 1893-1904.
- Zeng, Zhao, et Mukhopadhyay. 2002. « Flt-1-Mediated Down-Regulation of Endothelial Cell Proliferation through Pertussis Toxin-Sensitive G Proteins, By Subunits, Small GTPase CDC42, and Partly by Rac1 ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (6): 4003-4009. doi:10.1074/jbc.M110842200.
- Zhang, Mei, Xuan, Bouxsein, von Stechow, Akeno, Faugere, Malluche, et al. 2002. « Osteoblast-Specific Knockout of the Insulin-like Growth Factor (IGF) Receptor Gene Reveals an Essential Role of IGF Signaling in Bone Matrix Mineralization ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (46): 44005-44012. doi:10.1074/jbc.M208265200.
- Zhang, X, Yang, Lin, Chen, Ma, Zhou, et Ao. 2006. « Runx2 Overexpression Enhances Osteoblastic Differentiation and Mineralization in Adipose--Derived Stem Cells *in vitro* and *in vivo* ». *Calcified Tissue International* 79 (3): 169-178. doi:10.1007/s00223-006-0083-6.
- Zhang, Xiaofeng, Nan, Wang, Chen, Wang, Xie, Ma, et Wang. 2013. « Model Microgravity Enhances Endothelium Differentiation of Mesenchymal Stem Cells ». *Naturwissenschaften* 100 (2): 125-133. doi:10.1007/s00114-012-1002-5.
- Zhang, Z., Neiva, Lingen, Ellis, et Nör. 2010. « VEGF-Dependent Tumor Angiogenesis Requires Inverse and Reciprocal Regulation of VEGFR1 and VEGFR2 ». *Cell Death and Differentiation* 17 (3): 499-512. doi:10.1038/cdd.2009.152.
- Zhao, Laschinger, Arora, Szász, Kapus, et McCulloch. 2007. « Force Activates Smooth Muscle A-Actin Promoter Activity through the Rho Signaling Pathway ». *Journal of Cell Science* 120 (10): 1801-1809. doi:10.1242/jcs.001586.
- Zhong, Bai, et Chen. 2009. « Advanced Oxidation Protein Products Inhibit Proliferation and Differentiation of Rat Osteoblast-like Cells via NF-kappaB Pathway ». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 24 (1-2): 105-114. doi:10.1159/000227818.
- Zoncu, Efeyan, et Sabatini. 2011. « mTOR: From Growth Signal Integration to Cancer, Diabetes and Ageing ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (1): 21-35. doi:10.1038/nrm3025.



ANNEXES

Listes des communications et Prix	211
CV	212
Posters	214

LISTES DES COMMUNICATIONS ET PRIX

➤ Publications soumises :

RhoGTPases as key players in cell adaptation to microgravity

F. Louis, C. Deroanne, B. Nusgens, L. Vico, A. Guignandon

Biomed Research International, for Special Issue "How Microgravity Affects the Biology of Living Systems".

Small GTPase RhoA-controlled Inhibition of Adipogenesis by Strontium Chloride in a Multipotent Cell Model

C. Fournier, F. Louis, S. Peyroche, M. Thomas, A. Perrier, V. Dumas, A. Rattner, L. Vico and A.

Guignandon

Bone, Elsevier.

➤ Publication à soumettre :

Counteraction of strontium chloride against simulated microgravity-induced alteration of multipotent cell commitment through stimulation of RhoGTPase

F. Louis, W. Bouleftour, A. Rattner, M. Linossier, S. Peyroche, L. Vico, A. Guignandon

Plos One.

➤ Communications orales :

2014 : Limiter l'ostéoporose grâce à un antioxydant qui joue sur la dynamique du cytosquelette des cellules souches osseuses. Journée de la Recherche de l'ED SIS 488, Saint-Etienne, Juin 2014. F. Louis, C. Fournier, S. Peyroche, L. Vico and A. Guignandon (*1er Prix du jury*)

2014 : Signaling by matrix-bound VEGF controls the lineage commitment of multipotent mesenchymal progenitors. Journées Françaises de Biologie du Tissu Minéralisé, Limoges Mai 2014.

F. Louis, S. Peyroche, M. Linossier, L. Vico, A. Guignandon (*Prix du jury*)

2013 : Comment contrer les effets de la microgravité sur l'os ? Journée de la Recherche de l'ED SIS 488, Saint-Etienne, Juin 2013.

F. Louis, L. Vico, A. Guignandon (*1er Prix des étudiants, 3ème Prix du jury*)

2013 : Optimisation de co-culture 3D dynamiques en bioréacteur. Journées Françaises de Biologie du Tissu Minéralisé, Poitiers Mai 2013.

F. Louis, L. Vico, A. Guignandon (*1er Prix du jury*)

➤ Communications affichées :

2014 : Regulation of Adipo- & Osteo-genesis of Multipotent Cells by Strontium through stimulation of small Rho GTPases: A 3D bioreactor study, European Calcified Tissue Society, Prague (Czech Republic) Mai 2014.

F. Louis, S. Peyroche, M. Linossier, L. Vico, A. Guignandon

2013 : Quelle action métabolique pour le Ranélate de Strontium ? Journée Ifresis, Saint-Etienne, Novembre 2013.

F. Louis, M. Linossier, L. Vico, A. Guignandon

2012 : Les microcristaux d'apatite modulent la mécanotransduction des cellules souches, Journée Ifresis, Saint-Etienne, Novembre 2012.

F. Louis, M. Himmad, L. Vico, P. Tracqui, A. Guignandon



Fiona Louis

88 Cours Fauriel
42100 St-Etienne (France)
+33 (0)6 32 21 07 40
fio.louis@gmail.com
16/05/1988
26 years old
Driving licence

Doctor-Engineer in Cellular and Molecular Biology - Bioprocess engineering -

QUALIFICATIONS :

2006

Advance
Biology/Chemistry/
Physic/Mathematical
courses for Engineer
Schools admissions

Lycée Chateaubriand, Rennes
(France)

2008

Biological Engineer
Diploma : Speciality
"Bioprocess for
Pharmaceutical
Industry"

Polytech' Clermont-Ferrand
Engineer School, (France)

2011

Inter-University Diploma
on Conventional and
Transgenic Animals
Models for Biological
and Medical Research

Ecole Normale Supérieure
et University Claude
Bernard, Lyon (France)

2012

PhD in Bone
Biology
Laboratory LBTO,
INSERM U1059

University of Lyon at Saint-Etienne
(France), Pr Laurence Vico's team

2014

LABORATORY SKILLS :



European Space Agency
Agence spatiale européenne



➤ PhD (2011-2014) : INSERM U1059 – **Bone Biology Laboratory**,
Saint-Etienne (France)

"Strontium ranelate as a countermeasure against the deleterious effects of microgravity on osteoblastogenesis in in vitro models for space biology"

Research project partly funded by **the European Space Agency (ESA)**: ERISTO (European Research in Space and Terrestrial Osteoporosis) project, and **by Servier Laboratory** (France) for the other part.

Director: Dr. Alain Guignandon

Cellular
Biology

Culture of mesenchymal stem cell line (C3H10T1/2), **endothelial cells line** (EA.hy 926), **adipocytes line** (3T3-L1), **primary cell cultures** of mouse calvarias, white or brown adipose tissues, **hematopoietic cell line** (K562). **3D cultures** on polystyrene beads in a **rotating bioreactor simulating microgravity**. **3D cultures** on porous Si-C-HA scaffolds.

Biochemistry
& Cell Imaging

Development of **ELISA and G-Lisa** (active form of G proteins) assays for **2D and 3D cultures** tests. **Immunofluorescence imaging video microscopy** (migration, adhesion, cytoskeleton, transfections with fluorescent proteins...). Growth activity and proliferation assays. **Reactive oxygen species assays**. Cell staining. **Flow cytometry**.

Synthesis of apatite minerals complexed to collagen.

Molecular
Biology

Amplification and preparation of **plasmid DNA**, and **extraction of RNA**, **DNA and protein assay**. Development and **RT-qPCR assays** (design, specificity and efficiency of primers).

Animal
Experimentation

Participation in the laboratory projects (tattoos, weights, length measurements, euthanasia, bone, muscle or abdominal fat dissections (murine hypergravity and vibrations experiments, periodontal pathology in rats...)).

Management

Managing 5 students: a 15 year old student (one week), a student in Biological Analyses (Higher Technician Certificate) (6 weeks), a student in 3rd year undergraduate Biology-Biochemistry (6 weeks), 2 student in 1st year of Cell Biology and Physiology Master (3 months).

Teaching

64h/year at the Faculty of Science and Technology, University Jean Monnet, Saint-Etienne
Supervision of Biology Bachelor degree exams, writing courses, exams correction, practical biology courses, groups of 30 undergraduated students: Cell Biology, Genetic Engineering, Bioenergetic, Enzymology, Biochemistry.



➤ **Engineer trainee (6 months, 2011)** at **Grenoble CEA** in the Institute of Research and Technology for Life Sciences (IRTSV) in Chemistry and Biology Metals Unit (LCBM, UMR CEA-CNRS-UJF) (France)

Systems Biology approach of Cellular Iron Homeostasis in animals and its behavior in case of deficiency.

Culture of hematopoietic cells (K562), RNA extractions, RT-qPCR, electrophoresis (EMSA), transfections, flow cytometry, enzyme assays, indicative activities (luciferase), effects of oxidative stress measures, imaging cell by epifluorescence, coaching a student of first year undergraduate in Biotechnology Health.

➤ **Communications on 2011 work :**

• **Chapter (2014)** : E Pourcelot, N Mobilia, A Donzé, **F Louis**, O Maler, P Mossuz, E Fanchon, JM Moulis

Cellular iron regulation in animals: need and use of suitable models, 01/2014; ISBN: 978-3-7315-0079-7, NUTZEN-RISIKO-BEWERTUNG VON MINERALSTOFFEN & SPURENELEMENTEN, Biochemische, physiologische und toxikologische Aspekte, KIT Scientific Publishing.

• **Proceeding (2013)** : Pourcelot E, Mobilia N, Donze A, **Louis F**, Maler O, Mossuz P, Fanchon E and Moulis JM

Cellular iron homeostasis in Leukemia: Experimental and modeling approaches.

American Journal of Hematology, 2013, 88(5): E65-E65.

• **Poster (2012)** : Pourcelot E, Mobilia N, Donzé A, **Louis F**, Maler O, P. Mossuz, Fanchon E, Moulis J-M

Cellular Iron Regulation in Animals: Need and Use of Suitable Models, Karlsruhe Institute of Technology, 2012.

➤ **Researcher trainee (3 months, 2010)** at **Laboratory of Life Sciences and Environment in Matsue** (Japan)

Arachidonic cascade regulation and its role in different life stages of adipocytes.

Antibodies production in mice against two prostaglandins (immunization and extraction), adipocytes culture (3T3-L1), plasmids sequencing, ELISA, PCR, DNA extraction and RNA tests.

➤ **Technician (6 weeks, 2009)** at **Boiron Laboratory** (Homeopathy), Rennes (France)

Preparatory Division (preparation and packaging of homeopathic globules and granules) and Shipping Division (picking, checking and packing).



OTHER ACQUIRED SKILLS :

Engineer Skills

Communication, Negotiation, Economics, Employment Law, Insurance and Quality, Project Management (for instance spaceflight conditions preparation), Lean Management...

2012 : Autoclave conducting formation, Saint-Etienne (France).

2012 : Prevention and Civic Aid Certificate level 1 (PSC1).

Languages

➤ **English** : writing, reading and speaking, scientific publications and communications, TOEIC 910/990, Three-month internship abroad (Japan) (2010), Study abroad three weeks in Birmingham (UK) (2007).

➤ **Japanese** : basics & **Spanish** : basics

Statistics & Computing

Pack Microsoft Office 2003 et 2010, Image J, Zotero, GraphPad Prism 5...

➤ **Publication submitted :**

F. Louis, C. Deroanne, B. Nusgens, L. Vico and A. Guignandon

RhoGTPases as key players in cell adaptation to microgravity, *Biomed Research International*, for Special Issue "How Microgravity Affects the Biology of Living Systems", to be published on November, 2014

➤ **Oral Posters and Awards :**

2014 : Signaling by matrix-bound VEGF controls the lineage commitment of multipotent mesenchymal progenitors. French Day of Mineralized Tissue Biology JFBTM 2014, Limoges (France) - Prize Poster.

2014 : Limitation of osteoporosis thanks to an antioxidant acting on stem cells cytoskeleton dynamics. Research Day 2014, Saint-Etienne (France) - 1st Jury Prize.

2013 : Optimizing dynamic 3D co-cultures in bioreactors.

French Day of Mineralized Tissue Biology JFBTM 2013, Poitiers (France) - 1st Prize Poster.

2013 : How to counter the effects of microgravity on bone?

Research Day 2013, Saint-Etienne (France) - 1st PhD students Prize, 3rd Jury Prize.

➤ **International poster :**

2014 : Regulation of Adipo- & Osteo-genesis of Multipotent Cells by Strontium through stimulation of small Rho GTPases: A 3D bioreactor study, ECTS 2014, Prague (Czech Republic)

Communications

HOBBIES :

➤ **Associations involvement :**

2009
-
2010

President and Head of Communications & Vice-Treasurer

Arts Association & Biological Department Association at Polytech'Clermont-Ferrand

2011
-
2012

Forum organization :
Biotechno Rhône-Alpes

Meeting between PhD students and industry at Lyon (Soliciting responsible)

2011
-
2014

Secretary of Saint-Etienne PhD Students Association

Planning events between PhD students, meetings and reports writing

➤ **Dance** : courses of Rock, Salsa, Swing.

➤ **Drawing and Painting** (Courses at Applied Arts School in Rennes, associations t-shirts and sweat designs)

➤ **Guitare and Traveling** (Japan, Norway, Belgium, Italy, Spain, Ireland, Portugal, Czech Republic, Netherland...)



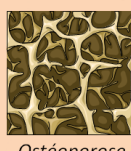
INTRODUCTION

L'ostéoporose est une maladie, qui touche surtout les femmes ménopausées et les cosmonautes. Avec la vieillesse ou en apesanteur la masse osseuse diminue et un risque de fracture apparaît.

Structure osseuse



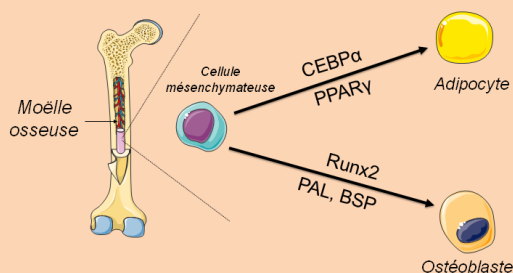
Ostéoporose



Le Ranélate de Strontium est un médicament ayant un effet antifracturaire pouvant être expliqué par sa double action, à la fois **benéfique sur la formation** et **inhibiteur sur la résorption osseuse**.

MATÉRIEL & MÉTHODES

Cellules utilisées :



Les cellules souches mésenchymateuses utilisées (C3H10T1/2) sont des cellules de la moelle osseuse pouvant se différencier en adipocytes ou en ostéoblastes. C'est cette balance qui est déréglée dans le cas de l'ostéoporose.

Milieux utilisés : milieu adipogénique (Rosiglitazone) ou milieu neutre.

Statistiques : One-way Analysis of Variance (ANOVA) + Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons post hoc test.

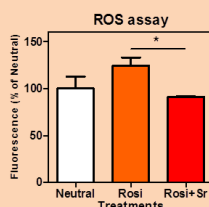
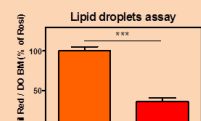
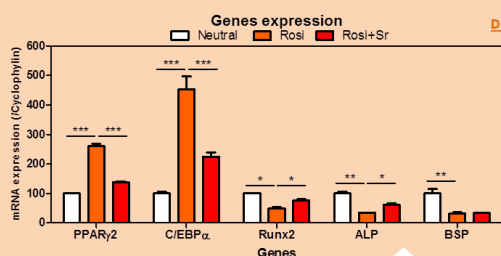
ACTION DU RANÉLATE DE STRONTIUM

Rosi 0 mM Sr Rosi 3 mM Sr



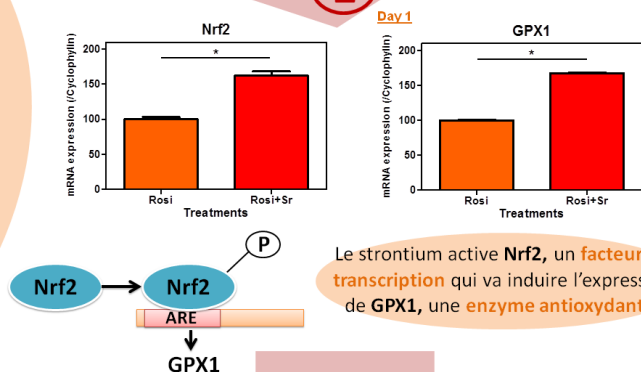
Adipocytes

Le strontium inhibe l'adipogénèse et les espèces réactives de l'oxygène
→ **effet antioxydant**



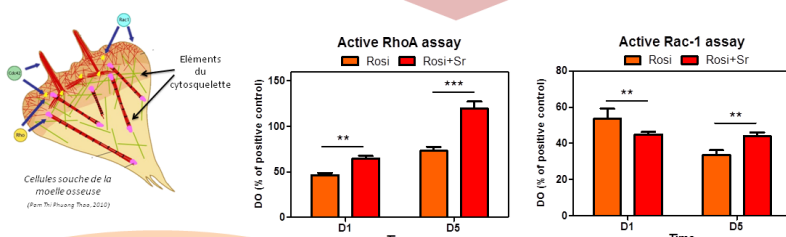
RÉSULTATS

①



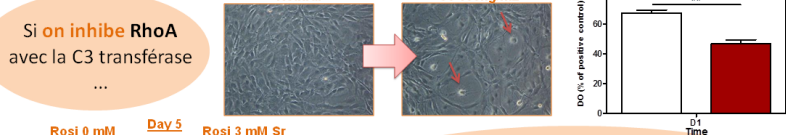
Le strontium active **Nrf2**, un **facteur de transcription** qui va induire l'expression de **GPX1**, une **enzyme antioxydante**.

②



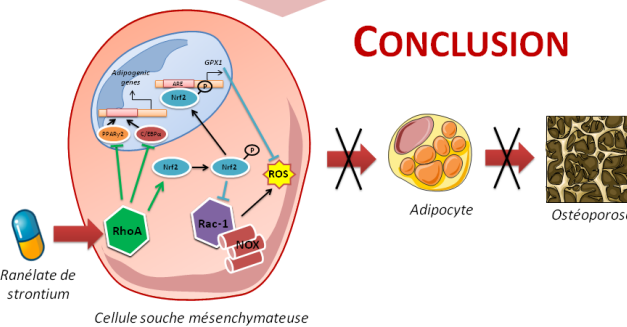
Le **GTPases** sont des protéines qui modulent le **cytosquelette** et la **forme des cellules**.

③



Lorsque **RhoA** est inhibé, l'action **inhibitrice** du strontium sur l'adipogénèse ne se produit plus. Les adipocytes reviennent ainsi que les espèces réactive de l'oxygène.

④



CONCLUSION

L'action **antioxydante** du strontium permet d'inhiber la croissance des adipocytes et donc la venue de l'ostéoporose. En **activant RhoA** il limite la **génération d'espèces réactives de l'oxygène** en **activant les enzymes antioxydantes** et **inhibe l'expression des gènes de l'adipogénèse**.

Regulation of Adipo- & Osteo-genesis of Multipotent Cells by Strontium through stimulation of small Rho GTPases: A 3D bioreactor study.

LOUIS Fiona, PEYROCHE Sylvie, LINOSSIER Marie-Thérèse, VICO Laurence & GUIGNANDON Alain

Integrative Bone Biology Laboratory, Inserm U1059, University of Lyon at St-Etienne



Introduction

GTPases of the Rho family (RhoA et Rac1) control mechanical properties of multipotent cells (OB)
 • High RhoA activity (High cellular tension) → osteogenesis (OB)
 • Low tension → adipogenesis (AD)
 Strontium effects in simulated microgravity may be explained by its ability to modulate RhoGTPases activities ??

Methods

3D culture model on collagen-coated microbeads with multipotent murine C3H10T1/2 (MSC).

With or without 5mM Strontium

Ratio: 20 10⁶ cells / 100 beads

Plastic beads coated with collagen

Mineralized plastic beads

Osteogenic conditions (OB): microbeads then coated with collagen-complexed aspartate + 5 mg/ml of L-ascorbic acid, β-glycerophosphate, 10⁻⁸ M dexamethasone and 10⁻⁸ M dexamethasone

Adipogenic conditions (AD): 1 μM Rosiglitazone

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (day 0)

Differentiation + Simulated microgravity: 4 days

Differentiation + Simulated microgravity: 4 days

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

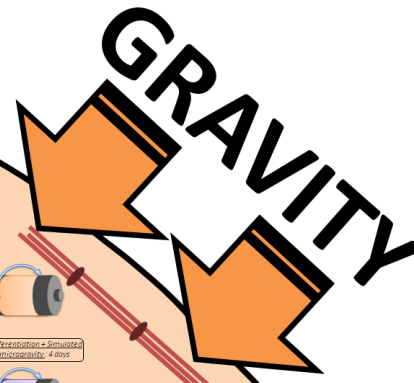
Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)

Staining RT-qPCR ELISA G-LISA (days 4 and 6)



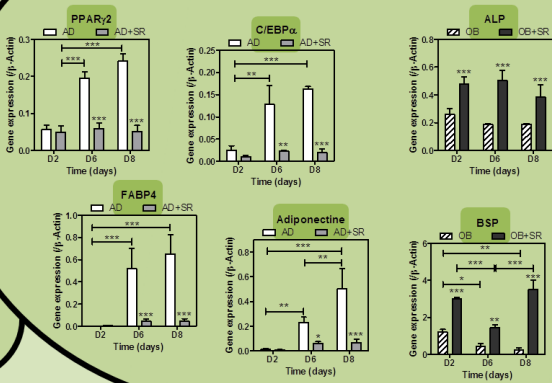
MICROGRAVITY

(Simulated)

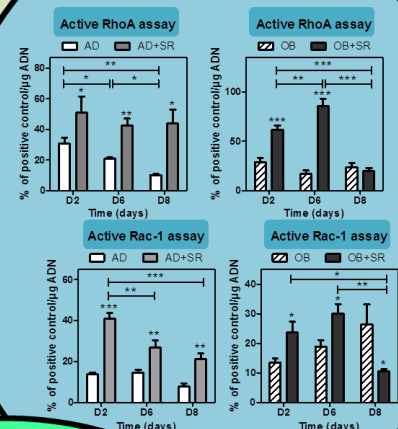
Results

Strontium action on MSC differentiation

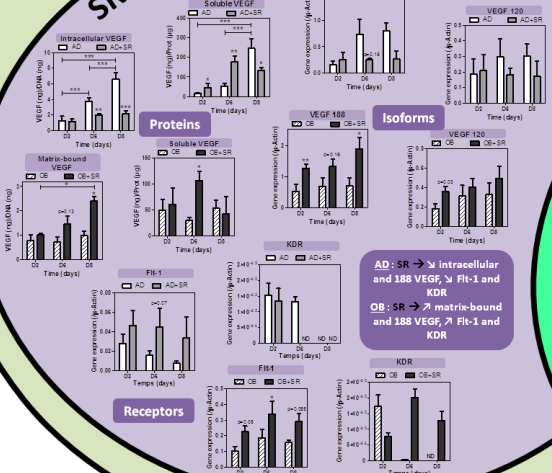
SR → ↓ AD and ↑ OB



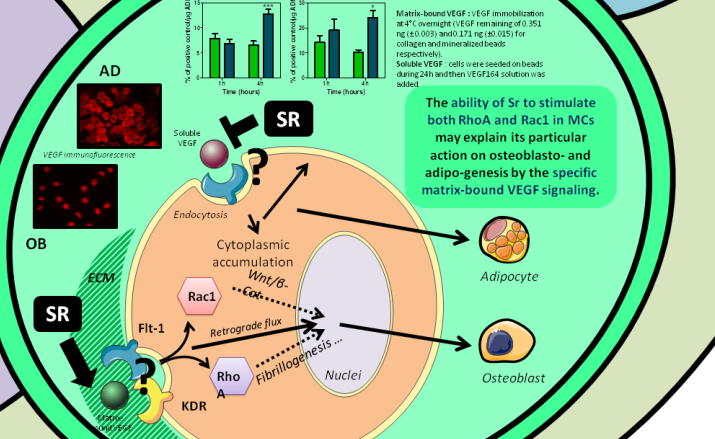
SR stimulates both RhoA and Rac1



SR actions on VEGF signaling



Conclusions



The ability of Sr to stimulate both RhoA and Rac1 in MCs may explain its particular action on osteoblast- and adipogenesis by the specific matrix-bound VEGF signaling.

Signaling by matrix-bound VEGF controls the lineage commitment of multipotent mesenchymal progenitors

LOUIS Fiona, PEYROCHE Sylvie, LINOSSIER Marie-Thérèse, VICO Laurence & GUIGNANDON Alain
Integrative Bone Biology Laboratory, Inserm U1059, University of Lyon at St-Etienne

Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale

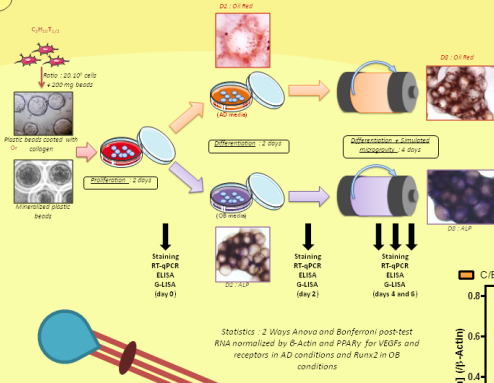
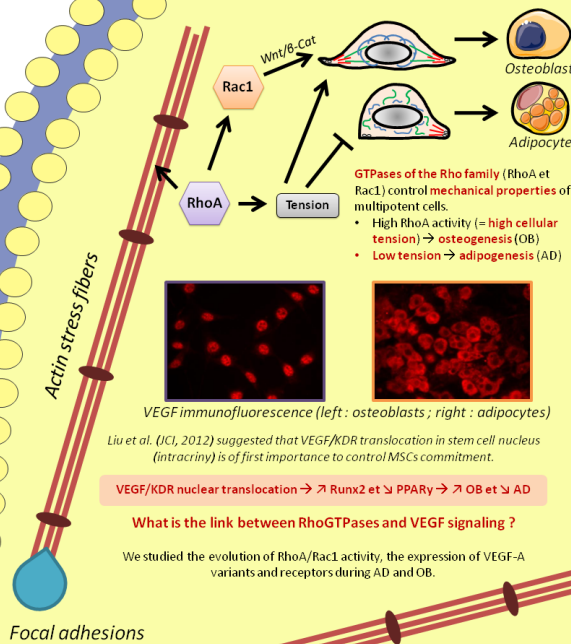
SERVIER

esa

Université Jean Monnet
SAINT-ETIENNE

LBO
Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux
Inserm U1059

Introduction



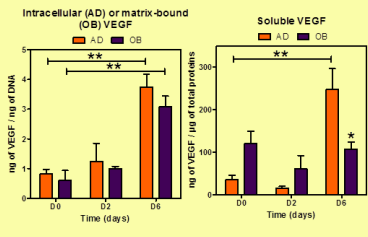
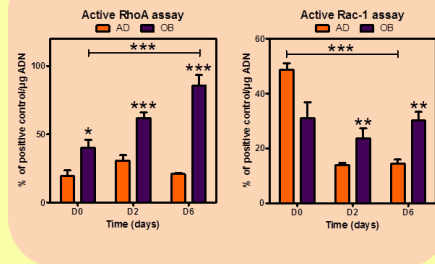
Methods

3D culture model on collagen-coated microbeads with multipotent murine C3H10T1/2 (MSC).
Osteogenic conditions (OB) : microbeads also coated with collagen-complexed apatite + 5 mM Strontium.
Adipogenic conditions (AD) : 1 μ M Rosiglitazone.

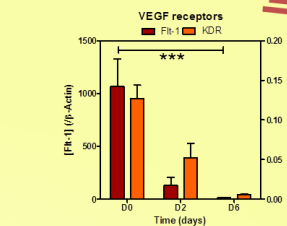
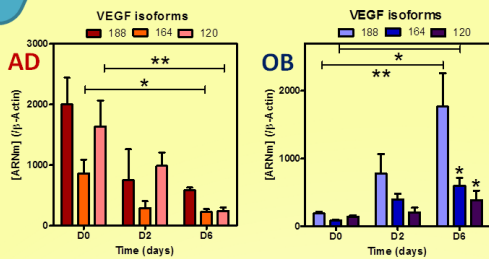
Results

AD : reduction of RhoA and Rac1 activities
OB : stimulation of RhoA and Rac1 activities

VEGF proteins regulation



AD : \downarrow intracellular and soluble VEGF
OB : \uparrow matrix-bound VEGF.



VEGF receptors

AD : \downarrow Flt-1 and KDR
OB : \uparrow Flt-1 and KDR.

AD : \downarrow VEGF 188, 164 & 120
OB : \uparrow VEGF 188

Conclusions

→ Specific signaling of mVEGF through RhoGTPases may control stem commitment and



ifresis

Institut Fédératif de Recherche en Sciences et Ingénierie de la Santé

Saint-Etienne

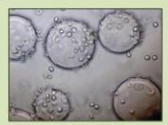
Quelle action métabolique pour le Ranélate de Strontium ?

Fiona LOUIS, Marie-Thérèse Linossier, Laurence VICO, Alain GUIGNANDON
Laboratoire de Biologie Intégrative du Tissu Osseux, Inserm U1059, Université de Lyon à St-Etienne

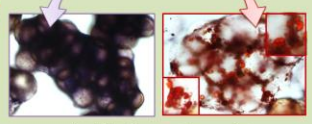


Matériel et Méthodes

Modèle de culture :

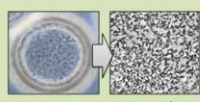


Cellules ensemencées sur des billes



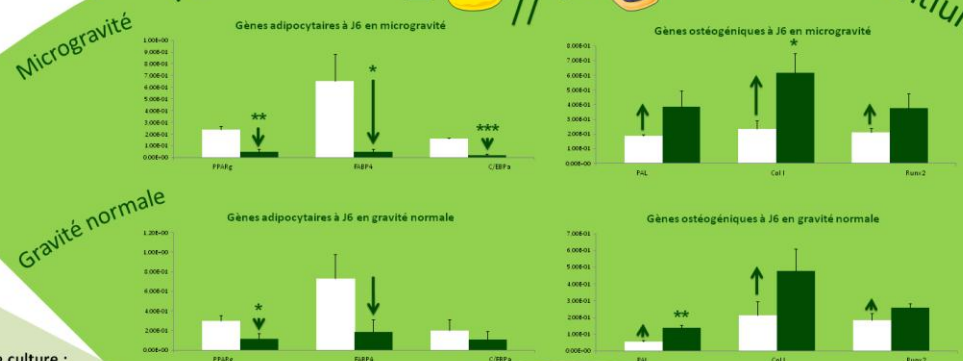
Les billes forment des agrégats ostéoblastiques ou adipocytaires (coloration de la phosphatase alcaline et des vésicules lipidiques)

- Cellules souches multipotentes : C3H10T1/2
- Culture sur billes de polystyrène recouvertes de collagène (Cytodex)
- Billes optimisées pour l'ostéogénèse : recouvertes de minéraux d'hydroxyapatite par précipitation de calcium et de phosphate
- PCR 3D N=3, PCR 2D N=6 (normalisation / β -Actine), EUSA et G-Lisa N=3 ou 4, * : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ par Test Student.



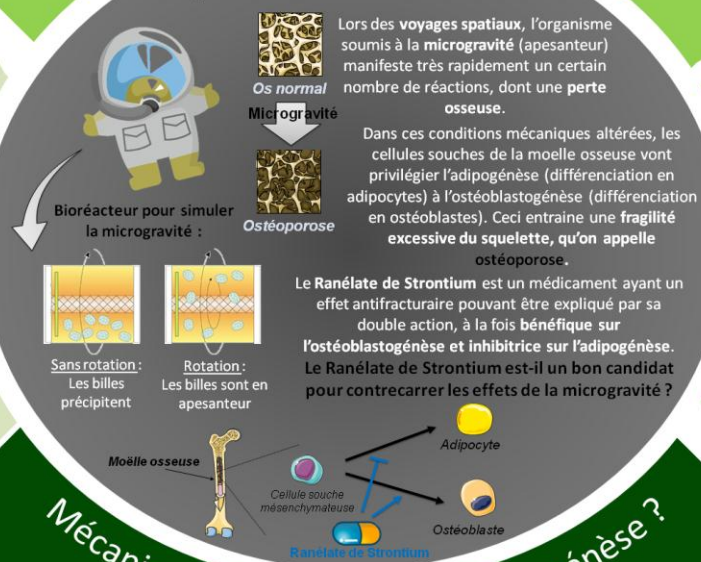
Minéralisation des billes Zoom sur les minéraux

Résultats : La double action du Ranélate de Strontium

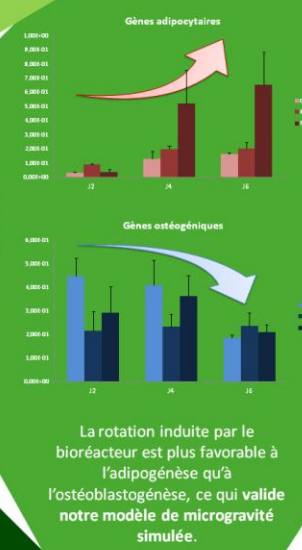


→ Le Ranélate de Strontium confirme sa double action à la fois inhibitrice de l'adipogénèse et activatrice de l'ostéogénèse, et ceci même en microgravité.

problématique

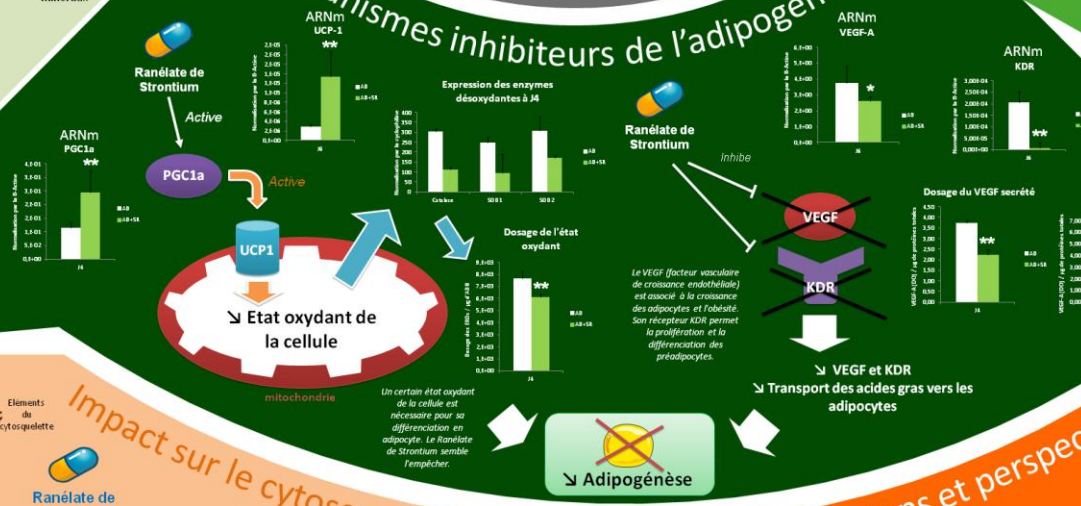


Effet de la microgravité ?

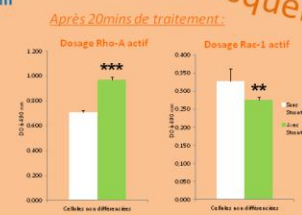
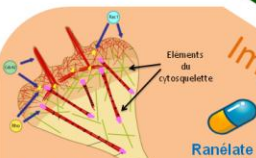


La rotation induite par le bioréacteur est plus favorable à l'adipogénèse qu'à l'ostéogénèse, ce qui valide notre modèle de microgravité simulée.

Mécanismes inhibiteurs de l'adipogénèse ?



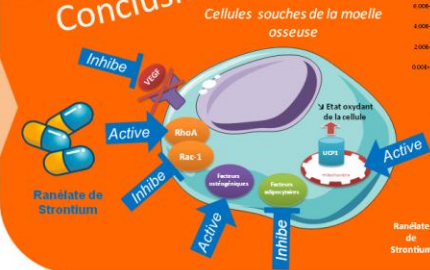
Impact sur le cytosquelette des cellules ?



→ Le Ranélate de Strontium active RhoA, une protéine du cytosquelette permettant de stimuler la différenciation ostéogénique et inhibe Rac-1 nécessaire à l'adipogénèse.

Son action est rapide et concerne les cellules qui ne sont pas encore engagées dans une voie de différenciation.

Conclusions et perspectives



→ Le Ranélate de Strontium permet, en agissant sur plusieurs voies métaboliques, de limiter l'adipogénèse et de renforcer l'ostéogénèse afin de pallier à l'ostéoporose engendrée par la microgravité.

→ Les perspectives envisagées sont de mettre en évidence sur quel type de VEGF le Ranélate de Strontium agit précisément (soluble ou matriciel ?) pour mieux comprendre son effet ostéostimulateur.

Comment contrer les effets de la microgravité sur l'os ?

Fiona Louis, Laurence Vico, Alain Guignandon

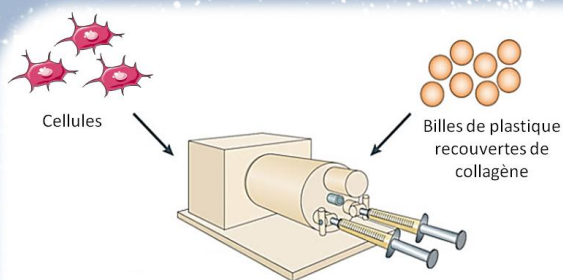
Laboratoire de Biologie Intégrative du Tissu Osseux, Inserm U1059, 42023 Saint-Etienne

Lors des voyages spatiaux, l'organisme soumis à la **microgravité** (apesanteur) manifeste très rapidement un certain nombre de réactions, comme une modification des tissus musculaires et aussi une **perte osseuse**.

Dans ces conditions mécaniques altérées, les cellules souches de la moelle osseuse vont privilégier l'adipogénèse (différenciation en adipocytes = cellules grasses). Ceci entraîne une **fragilité excessive du squelette**, due à une diminution de la masse osseuse et à l'altération de sa microarchitecture, qu'on appelle **ostéoporose**.

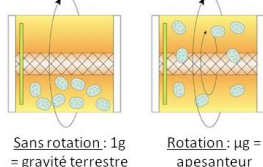
Le **Ranélate de Strontium** est un médicament ayant un effet antifracturaire pouvant être expliqué par sa double action, à la fois **bénéfique sur la formation** et **inhibiteur sur la résorption osseuse**.

Dans ce contexte, l'objectif général est donc de démontrer que le ranélate de strontium peut être un bon candidat pour **contrecarrer les effets de la microgravité**.



Bioréacteur simulant la microgravité

Les cellules ensemencées sur les billes sont **entraînées par la rotation** du milieu et se retrouvent en « orbite ».



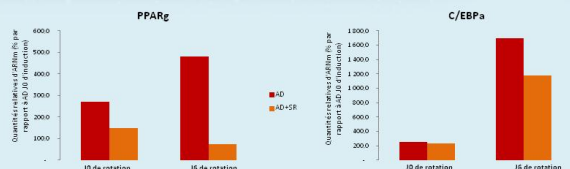
Cellules ensemencées sur les billes



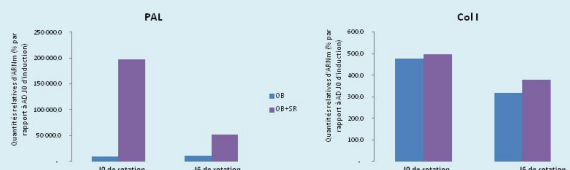
Les billes forment des agrégats

Résultats :

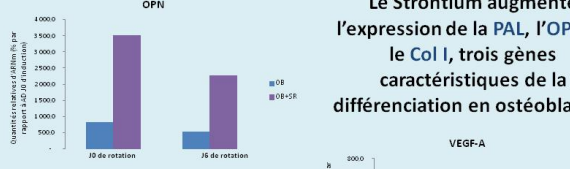
La différenciation des cellules souches en adipocytes et en ostéoblastes fonctionne bien dans le bioréacteur et les billes forment des agrégats, un environnement en 3D plus physiologique et permettant les échanges cellulaires.



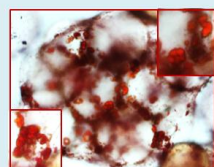
Le Strontium diminue l'expression de PPARγ et C/EBPα, deux gènes caractéristiques de la formation des adipocytes.



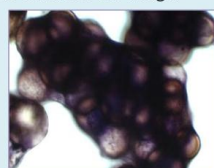
Le Strontium augmente l'expression de la PAL, l'OPN et le Col I, trois gènes caractéristiques de la différenciation en ostéoblastes.



De plus, le Strontium augmente l'expression de VEGF, un facteur permettant la croissance des vaisseaux sanguins.

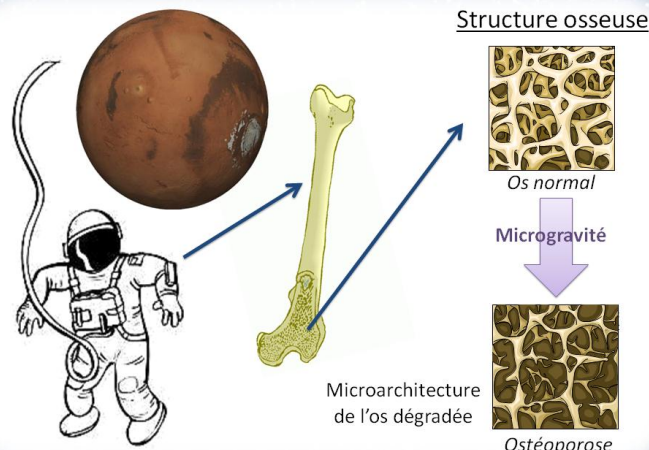


Adipocytes sur les billes : vésicules de gras colorées en rouge.

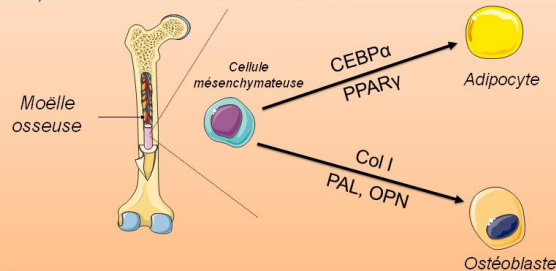


Ostéoblastes sur les billes : marquage de la phosphatase alcaline (PAL) en violet.

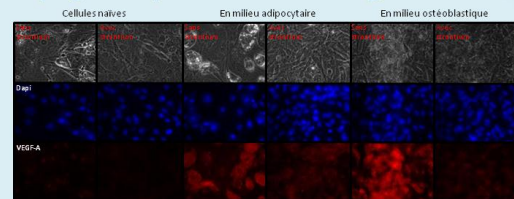
Conclusions et perspectives : La culture réalisée en bioréacteur rotatif fournit de **bonnes conditions de différenciations** et en microgravité. Dans ce contexte, le strontium semble **inhiber la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse en adipocytes**, en favorisant la **différenciation ostéoblastique**. L'augmentation de l'expression du gène du VEGF observée chez les ostéoblastes n'est pas retrouvée au niveau protéique où il semble plutôt être inhibé. Est-ce que le Strontium, en **inhibant le VEGF**, permettrait justement de bloquer la différenciation en adipocytes, qui ont besoin d'un réseau vasculaire développé pour se différencier et stocker des acides gras ?



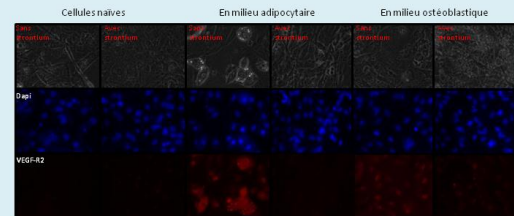
Matériel et méthodes : Les cellules utilisées sont des **cellules souches mésenchymateuses** qui peuvent se différencier à la fois en **adipocytes** (cellules grasses) ou en **ostéoblastes** (cellules osseuses). La microgravité est simulée par un **bioréacteur rotatif** qui, en entraînant les billes dans le milieu va permettre de limiter au maximum les forces appliquées sur les cellules, comme si elles étaient en « orbite ».



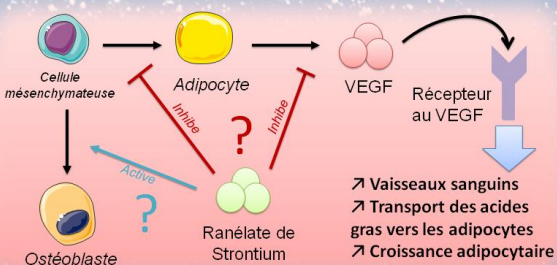
Marquage de la protéine VEGF en imagerie cellulaire :



Le **VEGF** se retrouve dans le cytoplasme des cellules. Son expression est particulièrement forte chez les ostéoblastes et légèrement moins chez les adipocytes. Le Strontium semble **inhiber drastiquement le VEGF**.



Le **récepteur du VEGF** se retrouve à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau chez les adipocytes, et seulement dans le noyau chez les ostéoblastes. De même, le Strontium **inhibe son expression** quelque soit les conditions.



Optimisation de co-cultures 3D dynamiques en bioréacteur

Fiona LOUIS, Laurence VICO, Alain GUIGNANDON

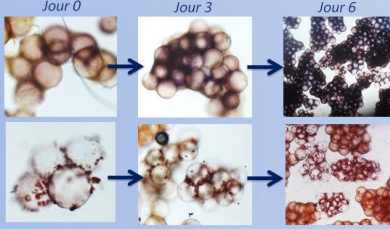
Laboratoire de Biologie Intégrative du Tissu Osseux, Inserm U1059, Université de Lyon à St-Etienne



Résultats : Optimisation de cultures 3D

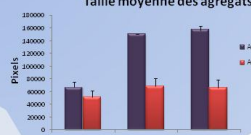
Induction : (colorations classiques Oil Red et Phosphatase alcaline)

Voie ostéoblastique



Voie adipogénique

Taille moyenne des agrégats



- Les deux types de différenciation sont effectifs après 6 jours de rotation, sans différences par rapport aux contrôles sans rotation.
- Les cultures ostéoblastiques forment des agrégats de billes plus importants, tandis que les agrégats adipocytaires stagnent à une quinzaine de billes.

Jour 3 d'induction



Rotation dans le RWV

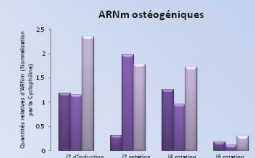
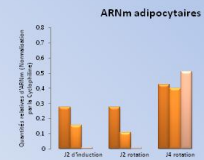


Sans rotation



Jour 6 d'induction

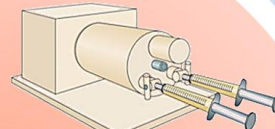
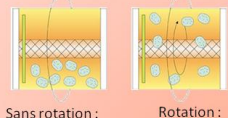
Les marqueurs en PCR montrent également les deux types de différenciation après 6 jours de rotation.



Cependant, la rotation semble être plus favorable à l'adipogénèse qu'à l'ostéoblastogénèse.

Résultats : Rotation et différenciations.

problématique

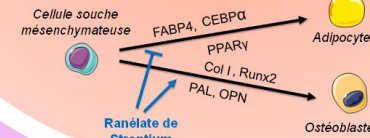


Rotating Wall Vessel

De nombreux systèmes de culture 3D dynamiques existent, mais peu permettent d'étudier des co-cultures de façon simple à partir de cellules multipotentes. La différenciation de plusieurs types cellulaires nécessite en général des milieux spécifiques et des temps de différenciation pouvant être très différents.

L'utilisation d'un bioréacteur rotatif horizontal (Rotating Wall Vessel, NASA) et la culture sur microsphères permettent d'optimiser ces cultures 3D de cellules multipotentes.

La réactivité de nos cultures a ensuite été testée en les traitant par du Ranélate de Strontium (SR). Cette substance est particulièrement indiquée puisqu'il augmente l'ostéogénèse et inhibe l'adipogénèse de nos cellules multipotentes.

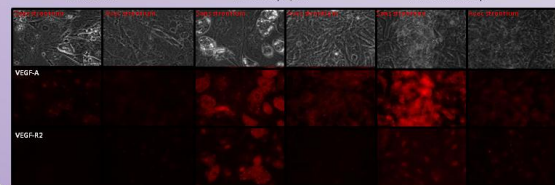
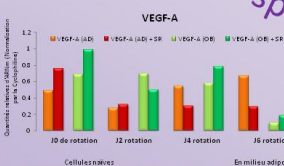


Application : Modèle du Ranélate de Strontium

Le Ranélate de Strontium inhibe fortement les différents marqueurs adipocytaires classiques. De plus, il semble renforcer les marqueurs ostéogéniques. La rotation induite par le bioréacteur et induisant une altération mécanique, inhibe aussi la voie ostéogénique.

Le Ranélate de Strontium confirme donc en culture 3D dynamique ses capacités anti-adipocytaire et pro-ostéogénique, et valide notre modèle de culture.

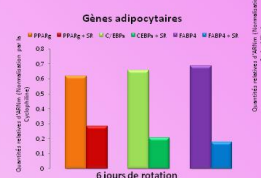
Perspectives : Impact sur le VEGF ?



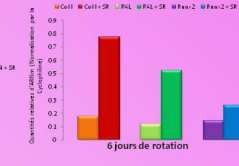
Impact du Ranélate de Strontium sur VEGF-A et VEGF-R2 au bout de 6 jours d'induction

- Le Ranélate de Strontium inhibe le VEGF-A chez les pré-adipocytes et l'active pour les pré-ostéoblastes, au niveau transcriptionnel ?
- Il inhibe la protéine VEGF-A et son récepteur R2 dans les deux voies de différenciation ?

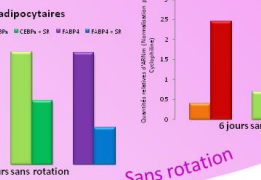
Rotation



Gènes ostéogéniques



OPN

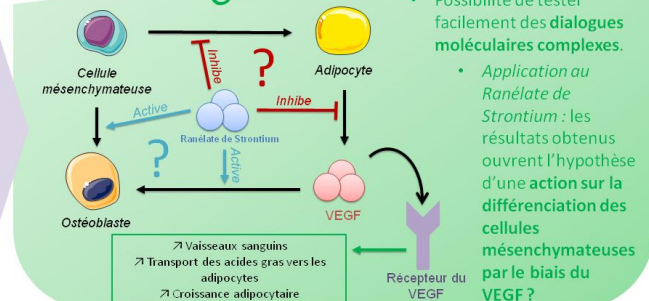


Sans rotation

Conclusions

- Culture 3D en RWV pouvant être appliquée pour d'autres combinaisons de cellules (ex : cellules endothéliales, musculaires, ostéoclastiques).
- Possibilité de tester facilement des dialogues moléculaires complexes.

- Application au Ranélate de Strontium : les résultats obtenus ouvrent l'hypothèse d'une action sur la différenciation des cellules mésenchymateuses par le biais du VEGF ?



Les microcristaux d'apatite modulent la mécanotransduction des cellules souches

Fiona Louis¹, Malika Himmad¹, Laurence Vico¹, Philippe Tracqui² & Alain Guignandon¹

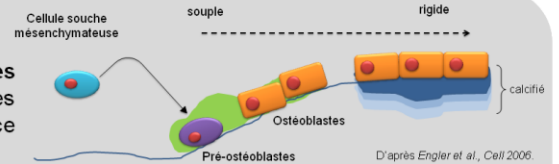
¹Laboratoire de Biologie Intégrative du Tissu Osseux, Inserm U1059, 42023 Saint-Etienne Cedex 2, France

²Laboratoire TIMC-IMAG, Equipe DynaCell, CNRS UMR 5525, 38706 La Tronche cedex, France

INTRODUCTION

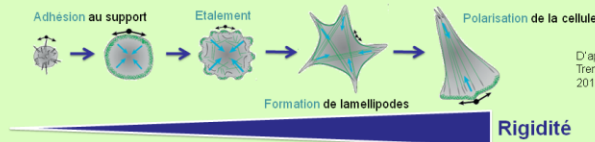
Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont la capacité à migrer vers les sites de remodelage, notamment les lacunes de résorption osseuse laissées après l'action des ostéoclastes, où elles vont se différencier en ostéoblastes et sécréter la nouvelle matrice osseuse. **Quels sont les déterminants qui régulent leur migration à ces sites ?**

La migration des CSM est dictée par leur capacité à la mécanotransduction (détection de la rigidité de la matrice extra-cellulaire (MEC)). Les zones de la MEC à remodeler perdent leur intégrité (topographique, chimique, mécanique). Selon le principe de la **durotaxie**, les CSM ne sont pas attirées vers ces zones à remodeler. Cependant, ces sites de résorption sont plus ou moins riches en apatites. **Nous souhaitons donc savoir si la mécanotransduction des CSM était affectée par la présence de cristaux d'apatite ?**

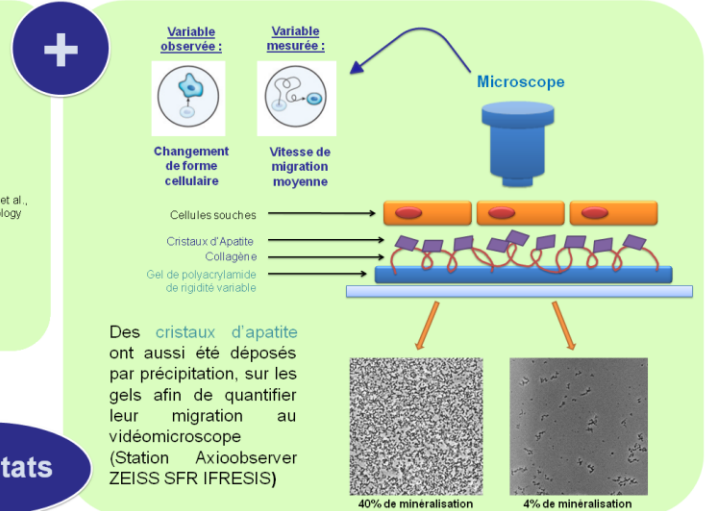


MÉTHODES

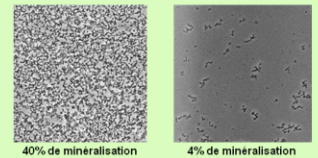
Pour répondre à notre question, nous avons donc fabriqué des **gels de polyacrylamide recouvert de collagène** (l'un des constituants majeur de la matrice extracellulaire osseuse) qui donnent un large éventail de rigidités pour tester les capacités de mécanotransduction de nos cellules souches pluripotentes C3H10T1/2 (Tracqui et al., *Biorheology*. 2009).



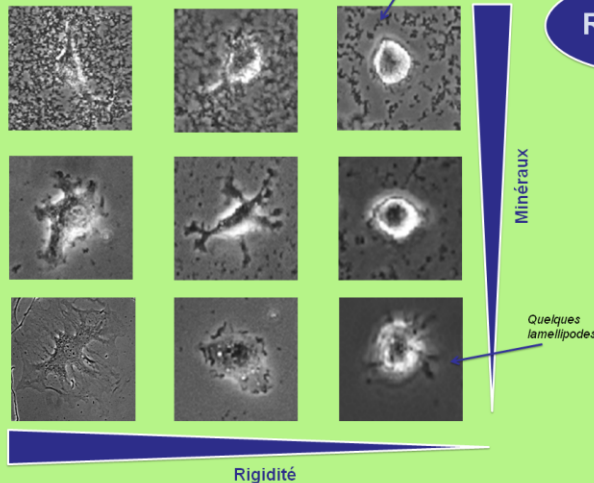
Une migration cellulaire faible sur un support souple ou élevée sur un support dur attestent d'une bonne mécanotransduction.



Des cristaux d'apatite ont aussi été déposés par précipitation, sur les gels afin de quantifier leur migration au vidéomicroscope (Station Axiobserver ZEISS SFR IFRESIS)

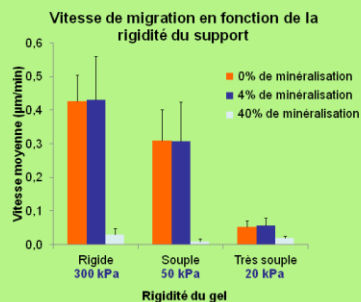


Impact des minéraux sur la morphologie



Résultats

Impact des minéraux sur la migration



- ❖ Vitesse de migration → dépendante de la rigidité du support
- ❖ Trop souple ou trop de minéraux : pas de migration

- ➡ Si le support est trop souple, la cellule ne peut pas s'étaler et activer le processus de migration.
- ➡ Si la concentration en minéraux est trop importante, elle inhibe l'impact mécanotransducteur du support et donc la migration cellulaire.

- Cellule sur support très souple (20 kPa) : Ne s'étalent pas, quelque soit la proportion de minéraux.
- Sur support souple (50 kPa) : Plus étalées, nombreux lamellipodes avec 4% de minéralisation.
- Cellules sur support rigide (300 kPa) : très étalées sans minéraux mais étalement très réduit lorsque la minéralisation augmente

➡ La présence de minéraux dans les gels minéralisés induisent une inhibition de l'étalement cellulaire. Qu'en est-il de la migration ?

RÉSUMÉ

- ❖ Il existe une quantité minimale de minéraux à partir de laquelle ceux-ci vont inhiber la migration cellulaire, donc la mécanotransduction.
- ❖ Ainsi la présence de minéraux module la mécanotransduction des cellules souches en simulant une réduction de la rigidité du support.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

La présence de minéraux semble donc un élément clé de la domiciliation des CSM aux sites de remodelage. La culture des cellules souches (MSC, ES ou iPS) sur des supports plastiques trop rigides (non physiologiques) qui peuvent limiter leur multipotence pourraient être optimisée par un revêtement de microcristaux bioactifs (apatites, silices, strontium).

- Résumé -

En impesanteur réelle ou simulée, l'absence de gravité oriente les cellules souches multipotentes de la moelle osseuse à privilégier l'adipogénèse au dépens de l'ostéogénèse. Ceci entraîne une perte osseuse fréquemment rencontrée chez les astronautes lors des vols spatiaux. Parmi les traitements médicamenteux existants, le strontium possède une double action, à la fois activatrice de l'ostéogénèse et inhibitrice de l'adipogénèse. Dans ce contexte, l'objectif général de ce projet de thèse a été de démontrer que le strontium peut être un bon candidat pour contrecarrer les effets de l'impesanteur. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux petites protéines Rho de la famille des GTPases, qui contrôlent le cytosquelette de la cellule, sa tension cellulaire ainsi que de nombreuses voies de signalisation. D'après la littérature, ces signalisations ont aussi été montrées comme étant liées aux voies du VEGF ou au statut oxydant des cellules, impliqués dans l'engagement des cellules souches multipotentes.

La première partie de cette étude a permis de montrer l'effet antioxydant du strontium sur la lignée C3H10T1/2 en tant qu'activateur de la GTPase RhoA, permettant l'induction du gène clé de la réponse antioxydante, Nrf2, et par conséquent l'inhibition de l'adipogénèse. La deuxième partie a utilisé comme modèle des cultures 3D sur microbilles de polystyrène recouvertes de collagène pour la culture d'adipocytes, avec l'ajout de minéraux d'apatite pour la culture d'ostéoblastes. Ces billes ont été mises en culture dans un bioréacteur simulant l'impesanteur (Rotating Wall Vessel, RWV, NASA). Sous strontium, cette culture en RWV a favorisé l'ostéogénèse et limité l'adipogénèse, validant l'utilisation du strontium en tant que répresseur des effets délétères de l'impesanteur sur l'os. Nous avons montré que cet effet peut être expliqué d'une part par la stimulation des activités des deux GTPases RhoA et Rac1, et d'autre part par l'induction de l'isoforme matricielle du VEGF chez les ostéoblastes. En revanche, chez les adipocytes, les deux formes solubles et matricielles du VEGF étaient inhibées. De plus, le strontium a induit l'expression du récepteur Flt-1 qui favoriserait l'ostéogénèse.

L'ensemble de ces données nous a permis de mieux comprendre les cinétiques de RhoA et Rac1 pendant l'ostéoblastogénèse et l'adipogénèse, ainsi que le rôle important des voies de signalisation du VEGF et du statut oxydant dans l'orientation de la différenciation des cellules multipotentes. Le strontium s'est révélé être un bon inducteur ostéogénique dont les applications fondamentales peuvent amener de nouvelles voies d'utilisation.

- Abstract -

In real or simulated microgravity, the absence of gravity directs multipotent stem cells from bone marrow to favor adipogenesis at the expense of osteogenesis. This causes a bone loss, commonly found in astronauts during spaceflight. Among existing drug therapies, strontium has a double action, both activating osteogenesis and inhibiting adipogenesis. In this context, the general objective of this project was to demonstrate that strontium may be a good candidate to counteract the microgravity effects. We were particularly interested in small proteins Rho of the GTPases family, which control cell cytoskeleton, cell tension and many signaling pathways. According to the literature, these pathways were also shown to be related to the VEGF signaling or the cell oxidative status, involved in the multipotent stem cells commitment.

The first part of this study demonstrated the strontium antioxidant effect on the C3H10T1/2 line as an activator of the GTPase RhoA, allowing the induction of the key antioxidant response gene, Nrf2, and therefore inhibiting adipogenesis. The second part used a 3D cultures model on polystyrene microbeads coated with collagen for the adipocytes culture, and with mineral apatite added for osteoblasts culture. These beads were cultivated in a bioreactor simulating microgravity (Rotating Wall Vessel, RWV, NASA). With strontium, this RWV culture promoted osteogenesis and limited adipogenesis, validating the use of strontium as a repressor of the microgravity deleterious effects on bone. We have shown that this effect can be explained first by the stimulation of both GTPases RhoA and Rac1 activities, and secondly by the induction of the matrix-bound VEGF isoform in osteoblasts. In contrast, in adipocytes, both soluble and matrix-bound VEGF isoforms were inhibited. Moreover, strontium induced Flt-1 receptor expression, which would promote osteogenesis.

All these data allowed us to better understand the RhoA and Rac1 kinetics during osteoblastogenesis and adipogenesis, and the important role of VEGF signaling pathways and oxidative status in directing multipotent cells differentiation. Strontium was found to be a good osteogenic inductor whose core applications can bring new ways of use.